Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Expresión recombinante de la Proteína de Cuerpos Esféricos 4 (SBP-4) de *Babesia bigemina*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:
Adolfo Cruz Reséndiz

Dirigido por:
Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Codirigido por:
Dra. Minerva Camacho Nuez

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito	_____
Presidente	Firma
Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón	_____
Secretario	Firma
Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú	_____
Vocal	Firma
Dr. Andrés Cruz Hernández	_____
Suplente	Firma
Dra. Minerva Camacho Nuez	_____
Suplente	Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Febrero del 2014
México

Expresión recombinante de la Proteína de Cuerpos Esféricos 4 (SBP-4) de *Babesia bigemina*

RESUMEN

La babesiosis bovina, una enfermedad transmitida de un bovino a otro por garrapatas, representa un importante problema de salud animal y al mismo tiempo un impacto económico debido a la disminución de la producción y la muerte de animales infectados. A la fecha, no existen vacunas seguras contra el parásito que confieran protección a los bovinos vacunados, por lo tanto se deben estudiar las proteínas del parásito involucradas en los mecanismos de invasión o escape del mismo. El objetivo del trabajo fue clonar y expresar de forma recombinante a la proteína de los cuerpos esféricos 4 (SBP4) de *B. bigemina*. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen *sbp4* en marco de lectura abierto (ORF) con un total de 774pb. Posteriormente, se purificó el DNA de *B. bigemina* cepa Chiapas a partir de garrapatas infectadas. Se realizó la amplificación por PCR del gen. El amplicón generado, se clonó en el vector pENTR™/D-TOPO®, el cual se usó para transformar células competentes *Escherichia coli* cepa *TOP10*. Posteriormente se purificó el DNA bacteriano de las clonas y se incubó con las enzimas de restricción *Not I* y *Asc I* para verificar la presencia del inserto, el cual se visualizó mediante electroforesis. De estas clonas se seleccionaron 2 positivas y se secuenciaron para corroborar el ORF. Se procedió a realizar la subclonación del gen en el vector pDEST™17, el cual se usó para transformar bacterias *E. coli* cepa *BL21-AI™.* Se indujo la expresión de la proteína agregando al medio L-arabinosa y se incubaron las bacterias por 3 horas. La identificación de la proteína se realizó por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-tag de histidinas en lisados de bacterias transformadas. Se observó una banda de aproximadamente 30 KDa confirmando la expresión de la proteína. Con esta metodología es posible obtener proteínas recombinantes que posteriormente pueden ser evaluadas como vacunas o métodos de diagnóstico contra la babesiosis bovina.

Palabras clave: Babesiosis, clonación, expresión, proteína recombinante, SBP-4.

SUMMARY

Bovine babesiosis, a disease transmitted to bovines by ticks, represents a significant problem in animal health and, at the same time, an economic impact due to a production lost and death of infected animals. To date, there is no a safe vaccines against the parasite, which could confer protection to vaccinated cattle, for this reason, parasite proteins involved in the mechanisms of invasion or escape must be studied. The objective of this work was to clone and express as a recombinant protein the spherical body protein 4 (SBP4) of *B. bigemina*. Oligonucleotides were designed to amplify the *sbp4* gene with a total of 774bp as an open reading frame (ORF). Subsequently, the DNA from *B. bigemina* Chiapas strain was purified from infected ticks. Amplification of the gene was performed by PCR. The amplicon generated was cloned into the pENTR™/D-TOPO® vector, which was used to transform competent *TOP10 Escherichia coli* cells. The DNA was purified from bacterial clones and was incubated with restriction enzymes *Not I* and *Asc I* to verify the presence of the insert, which was visualized by electrophoresis. Of these clones two positive ones were selected and were sequenced to confirm the frame. Subcloning of the gene was performed on the pDEST™ 17 vector, which was used to transform *BL21-AI™ E. coli* cells. The clones were induced for expression of the protein by adding L-arabinose to the medium and the samples were incubated for 3 hours. Identification of the protein was made by Western blotting using an antibody anti-his tag in lysates of transformed bacterial. A band of approximately 30 KDa was observed, confirming expression of the SBP4 protein. With this methodology it is possible to obtain recombinant proteins that can be evaluated as vaccines or diagnostics against bovine babesiosis.

Key words: Babesiosis, cloning, expression, recombinant protein, SBP-4.

A mi familia:
Por su apoyo, confianza y consejos que me han
brindado a lo largo de mis proyectos.

A mis profesores:
Por compartir sus conocimientos, que me han hecho
crecer personal e intelectualmente.

A mis amigos de toda la vida:
Por acompañarme en mi camino y en
cada uno de mis proyectos.

Los pensamientos no son más que sueños,
hasta que no se ponen a prueba
(William Shakespeare)

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Juan J. Mosqueda, por permitirme trabajar en su proyecto y contribuir en mi formación académica.

Al cuerpo académico Salud Animal y Microbiología Ambiental (SAMA), que fueron parte importante en el desarrollo del proyecto y mis asesores en la tesis.

A los programas de investigación FOFI-UAQ y FOPER, que permitieron concluir cada uno de los objetivos de este proyecto.

A mi familia por su apoyo incondicional, sus desveladas y preocupaciones, por sus regaños y motivaciones, por todo su esfuerzo para que yo siga cumpliendo mis sueños.

A mis amigos del laboratorio con los que compartí buenos y malos momentos, que no solo me transmitieron técnicas, métodos y protocolos sino también consejos, que me animaron en cada error y se alegraron con mis aciertos.

ÍNDICE

Página

Resumen i

Summary ii

Dedicatorias iii

Agradecimientos iv

Índice v

Índice de cuadros ix

Índice de figuras x

I. Introducción 1

Justificación 2

II. Revisión de literatura 5

Definición 5

Distribución 5

Impacto económico 5

Etiología 6

Ciclo de vida 6

Transmisión 9

Periodo de incubación 9

Lesiones post mortem 10

Diagnóstico 11

Tratamiento 11

Tratamiento preventivo 12

Expresión de proteínas 15

Clonación del DNA mediante métodos de DNA recombinante . 15
Enzimas de restricción y ligasas de DNA 15
Vectores de clonación 16
Expresión recombinante de proteínas 16
La proteína de los Cuerpos Esféricos 4 (SBP4) 17
III. Hipótesis 20
Objetivo general 20
Objetivos específicos 20
IV. Metodología 21
Área de estudio 21
Material y equipo 21
Métodos 21
Método para extraer DNA de garrapatas infectadas con *Babesia bigemina* 21
Método para amplificación del gen *sbp4* de *B. bigemina* 22
Método para la clonación del gen *sbp4* de *B. bigemina* 23
Método para la expresión recombinante de la proteína SBP4 .. 27
Método para determinación de la expresión de la proteína SBP4 29
V. Resultados 33
Extracción de DNA de *Babesia bigemina* 33
Amplificación del gen *sbp4* mediante PCR 34
Clonación del gen *sbp4* en un vector bacteriano 34
Expresión de la proteína SBP4 en un sistema bacteriano 38
VI. Discusión 41

VII. Conclusión 43

Apéndice 44

Material y equipo general 44

Material 44

Equipo 45

Material, equipo y reactivos para extraer DNA de garrapatas infectadas con *Babesia bigemina* 46

Material biológico 46

Material 46

Equipo 46

Reactivos 46

Soluciones 47

Material, equipo y reactivos para la amplificación del gen *sbp4* de *Babesia bigemina* 47

Material 47

Equipo 47

Reactivos 47

Soluciones 48

Material, equipo y reactivos para la clonación del gen *sbp4* de *Babesia bigemina* 48

Material 48

Equipo 48

Reactivos 49

Soluciones 49

Material, equipo y reactivos para la expresión de la proteína SBP4 de *Babesia bigemina* 50

Material 50

Equipo 50

Reactivos 50

Material para electroforesis de proteínas y Western Blot 50

Equipo para electroforesis de proteínas y Western Blot 50

Reactivos para electroforesis de proteínas y Western Blot 50

Soluciones 51

Bibliografía 54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro **Página**

2.1 Antígenos de *Babesia bovis* y *B. bigemina* caracterizados a la fecha..... 14

4.1 Oligonucleótidos para amplificación del gen *sbp4*..... 22

4.2 Protocolo para la reacción de PCR 22

4.3 Reacción de ligación con productos de PCR fresco..... 25

4.4 Protocolo para la reacción de restricción..... 26

4.5 Reacción de recombinación 27

4.6 Elaboración del gel separador..... 30

4.7 Elaboración del gel concentrador 30

5.1 Cuantificación del DNA extraído a partir de garrapatas infectadas con *B. bigemina* cepa Chiapas..... 33

5.2 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SBP4 de la cepa Kuttler y la cepa Cintalapa, Chiapas 37

5.3 Análisis Blast de la secuencia de aminoácidos de SBP4 37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura **Página**

2.1 Ciclo de vida de *Babesia bovis*..... 8

2.2 Fotografía de microscopia electrónica de un merozoito *Babesia bovis*..... 13

2.3 Localización celular de BbSBP-4 por microscopia laser confocal 18

4.1 Diagrama de termociclado para amplificar el gen *sbp4*..... 23

4.2 Características del vector pENTR^{TM} D-TOPO®..... 24

4.3 Características del vector de expresión pDEST^{TM} 17..... 27

4.4 Termociclado para células DH5α trasformadas 28

5.1 Electroforesis para evaluación de integridad de DNA extraído a partir de garrapatas infectadas con *B. bigemina* 33

5.2 Amplificación del gen *sbp4* (774pb) a partir de garrapatas infectadas con *B. bigemina*..... 34

5.3 Electroforesis de DNA plasmídico purificado de colonias transformadas con el vector de clonación pENTR^{TM} D-TOPO® (2580pb) 35

5.4 Electroforesis de la digestión enzimática con *Not I* y *Asc I*..... 36

5.5 Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida teñido con Coomassie ... 39

5.6 Western Blot para confirmar expresión de la proteína SBP4 de *Babesia bigemina*..... 40

5.7 Western Blot de lisado de bacterias con la proteína SBP4 no inducida e inducida..... 40

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis es una enfermedad que se presenta en una gran variedad de especies de animales vertebrados incluyendo al hombre, sin embargo, una de las especies en las que hay un mayor impacto es el ganado bovino por ser una especie de consumo humano. La babesiosis se caracteriza por causar signos clínicos como fiebre, anemia, hemoglobinuria, hemoglobinemia, letargia, anorexia, signos nerviosos y en muchas ocasiones, la muerte. Estos problemas son los causantes de las pérdidas económicas y de las inversiones millonarias que se emplean para el control de la enfermedad, que se acercan a los 3 billones de dólares (Bock *et al*., 2004; USAHA, 2008; Schnittger *et al*., 2012).

La babesiosis bovina en México es causada por dos especies de *Babesia: Babesia bigemina* y *Babesia bovis.* Es una enfermedad causada por protozoarios intraeritrocíticos y que se transmite de un animal a otro por medio de las garrapatas del género *Rhipicephalus* (Minjauw *et al*., 2003; Bock *et al*., 2004; Schnittger *et al*., 2012). Esta enfermedad causa problemas que repercuten en la industria ganadera, ya que en los bovinos productores de leche, disminuye su producción láctea, mientras que en el ganado de carne, causa pérdida de peso y frecuentemente causa la muerte. Aunque no se tiene el dato estimado de las pérdidas económicas en el país, se calcula que cerca del 75% de la población ganadera se encuentra en zonas de alta prevalencia; solo en el 2011 se registraron 555 focos de importancia epidemiológica en los que estaba presente la garrapata (Osorno, 1978; SIAP, 2008; Senasica, 2012).

A la fecha no hay vacunas comerciales contra esta enfermedad en México, ni hay vacunas recombinantes de ningún tipo en el mundo. Es por eso que se realizan investigaciones, con la finalidad de encontrar métodos para el control eficaz, ya sea del vector o del parásito. Y actualmente se están utilizando métodos basados en herramientas biotecnológicas, es decir, se están estudiando algunas proteínas del parásito involucradas en los mecanismos de invasión a las células blanco en

diferentes fases de su ciclo de vida, para expresarlas de forma recombinante y con estas generar vacunas que al ser aplicadas en los animales puedan montar una respuesta inmunitaria capaz de bloquear al parásito e impedir su replicación. Y es el caso de las proteínas de los cuerpos esféricos (SBP´s por sus siglas en ingles) de *Babesia* a las cuales se les han atribuido importancia en la infección y escape de los eritrocitos. Una proteína SBP que en estudios recientes se ha podido identificar es la llamada SBP-4 (Alaa *et al*., 2011a). Esta proteína se ha logrado observar en los cuerpos esféricos durante el desarrollo de *B. bovis* en su fase intraeritrocítica y que se observa distribuida en el citoplasma del eritrocito, lo que hace suponer que su importancia radica en esta parte de su ciclo de vida. En estudios recientes (aún no publicados) en *B. bigemina* se logró identificar, mediante herramientas bioinformáticas, una proteína con características similares.

Actualmente, SBP-4 se ha evaluado como una manera de diagnóstico en *B. bovis* (Alaa *et al*., 2011b) únicamente. A la fecha no se han hecho trabajos evaluando a esta proteína como candidato vacunal en ninguna especie de *Babesia*. En este trabajo se pretende expresar la proteína SBP-4 de *B. bigemina* de manera recombinante con la finalidad de evaluarla como una herramienta de diagnóstico en esta especie además de evaluar su potencial como candidato vacunal.

Justificación

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz para el control de la babesiosis. No hay métodos de diagnóstico sensibles y automatizados, ni hay vacunas recombinantes de ningún tipo en el mundo. Esto obliga a dirigir la investigación hacia el desarrollo de diversos métodos o técnicas que permitan generar tratamientos o vacunas que tengan un efecto mayor tanto en el parásito como en el vector, lo que a su vez, permitirá reducir las pérdidas económicas que año tras año ocurren por la disminución en la producción, gastos en tratamientos y mortalidad.

Actualmente los principales métodos de control y/o tratamiento de la enfermedad son el uso de medicamentos que ayudan a disminuir los síntomas, otros para controlar garrapatas transmisoras de la enfermedad, y en menor medida, tratamientos preventivos como las vacunas. Este último método es el más prometedor, ya que disminuiría los gastos que se realizan para controlar la enfermedad, y las pérdidas a consecuencia de los síntomas, no así las inversiones para el control del vector. Sin embargo, las vacunas contra la babesiosis que se han utilizado, sólo han mostrado ser efectivas si son a base del agente vivo atenuado. Esto es debido a varios factores pero el más importante es que el agente patógeno tiene muchas variaciones genéticas de una región geográfica a otra, y eso hace más difícil que haya una protección cruzada entre las diferentes cepas de *Babesia*. Las vacunas vivas tienen la desventaja que son difíciles de producir y pueden estar contaminadas con otros patógenos. Una vacuna a base de antígenos conservados producidos de forma recombinante resolvería en gran media estos problemas.

Esta deficiencia en las vacunas, ha generado un interés en la búsqueda de herramientas de biotecnología, y ha hecho posible el desarrollo de un nuevo tipo de vacunas las llamadas “vacunas recombinantes”. Este método se basa en la en la expresión de genes que codifican para proteínas de agentes patógenos a un organismo distinto al original, el cual va a generar las proteínas sin el riesgo de producir la enfermedad.

En estudios recientes se han identificado nuevos genes en *B. bovis* que codifican para proteínas de importancia en la invasión de los eritrocitos, y es el caso de SBP-1, SBP-2, SBP-3; todos encontrados en el complejo apical del protozoario. La última proteína que se identificó fue SBP-4. Esta proteína aún no se ha estudiado completamente en *B. bovis,* sin embargo se identificó una secuencia similar en *B. bigemina* que se transcribe y expresa, lo que hace creer que realiza la misma función en las 2 especies. Por lo tanto, el lograr la expresión recombinante de esta proteína permitirá que SBP4 sea evaluada como

herramienta de diagnóstico, como candidato vacunal y, sobre todo, generará información acerca de su función, localización y fases en las que se expresa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Definición

La babesiosis bovina también conocida como fiebre de Texas, piroplasmosis, fiebre por garrapatas, fiebre hematúrica; es causada por protozoarios intracelulares del *phylum* Apicomplexa, género *Babesia* (Uilenberg, 2006; Bowman, 2009). Es trasmitida principalmente por garrapatas del género *Rhipicephalus* (antes *Boophilus*). Los principales problemas que causa son: fiebre, hemoglobinuria, anemia, ictericia y varios casos la muerte (Homer, *et al*., 2002; Uilenberg, 2006; Hunfeld, 2008; Bowman, 2009; OIE, 2010).

Distribución

La distribución de esta enfermedad ocurre en las zonas trópicas y subtropicales del mundo como: son el centro y sur de América, Asia, África, algunas zonas de Europa, y en el contiene Australiano, esto la hacer ser una enfermedad de distribución mundial, y son las características climáticas que tienen estos lugares los que permiten que se desarrollen las garrapatas, vectores responsables de la trasmisión de la enfermedad. Los vectores más importantes son las garrapatas del género *Rhipicephalus,* anteriormente clasificadas taxonómicamente en el género *Boophilus* (Minjauw, 2003; Uilenberg, 2006; USAHA, 2008).

Impacto económico

En cuanto al impacto económico, esta enfermedad es muy importante, ya que es considerada como la segunda enfermedad parasitaria intraeritrocítica en los mamíferos. También representa un serio impacto económico por los costos de tratamiento, la mortalidad, los abortos, la disminución en la producción de carne y de leche, la reducción en la expresión del potencial genético de los animales y de

igual forma la dificultad de la movilización de los animales de una región a otra y aún más difíciles las movilizaciones por exportación entre los países (Schnittger *et al.,* 2012). Por otro lado también hay pérdidas a causa de los vectores que transmiten la enfermedad, ya que al infestar a los animales, les provocan lesiones en la piel, lo que, evita la venta de las pieles y también por la cantidad de sangre que ingieren las garrapatas les provocan una anemia sebera (Solorio y Rodríguez, 1997). Numéricamente la mejor referencia del impacto económico que tiene la enfermedad es el ahorro que tienen los Estados Unidos desde que se erradicó la enfermedad, esta cantidad es de 3 billones de dólares al año. Sin embargo también se cree que cerca de 2 billones de bovinos en todo el planeta están expuestos a la babesiosis (Schnittger *et al*., 2012).

Etiología

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Babés en 1888, quien identificó a *Babesia bovis* y posteriormente en 1893 fue descrita *Babesia bigemina* por Smith y Kilbourne. Otras especies que afectan a los bovinos son, *Babesia divergens* descrita por Mc Fadyean y Stockman en 1911 y *Babesia major* descrita por Sergent y col., en 1926 (Quiroz, 1990).

No obstante, en México únicamente se han identificado dos especies de *Babesia* causantes de la babesiosis bovina, las cuales son, *B. bovis* y *B. bigemina.* Éstas son trasmitidas por dos especies de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Osorno, 1978).

Ciclo de vida

El ciclo de vida del parásito ha sido muy importante para los trabajos recientes de investigación, que tiene la finalidad de desarrollar nuevos métodos de control de la enfermedad, tratando de identificar fases críticas para el desarrollo y

transmisión de la enfermedad, por lo que es necesario describirlo de manera detallada como a continuación se hace:

1) La garrapata ingiere sangre de un bovino infectado con *Babesia.* La *Babesia* está en su fase asexual, compuesta de merozoitos y trofozoitos. Sólo los merozoitos son infectivos.

2) Dentro de la garrapata, los merozoitos se transforman a gametocitos, los cuales se van a transformar en gametos femeninos y masculinos.

3) Se fusionan los gametocitos para formar un cigoto.

4) El cigoto va a infectar las células intestinales de las garrapatas.

5) Posteriormente estos cigotos van a destruir las células intestinales y van a viajar por la hemolinfa a varios órganos, hasta llegar a los ovarios de las hembras adultas de garrapata.

6) En los ovarios se van a infectar los huevos y antes de nacer las larvas ya estarán infectadas, lo que se conoce como transmisión transovárica. Para que los huevos puedan eclosionar necesitan ciertas condiciones climáticas, entre ellas, la humedad relativa de 80% y temperatura de 30 a 37° (Solorio y Rodríguez, 1997).

7) Las larvas se van a adherir a un bovino y la temperatura corporal induce la migración de los quinetos a las glándulas salivales de las larvas. Ahí se transforman en esporontes. De cada esporonte se forman cientos de esporozoitos.

8) A las 72 horas después de que las larvas se alimentan del bovino, los esporozoitos ya formados son liberados al torrente sanguíneo del bovino.

9) Una vez en la sangre de los bovinos, los esporozoitos invaden a los eritrocitos transformándose en trofozoitos, y a partir de cada trofozoito se van a generar dos merozoitos (en forma de peras).

10) Los merozoitos después de separarse seguirán dos caminos, uno aldrán de los eritrocitos para invadir otro eritrocito y transformarse en trofozoitos o podrán ser ingeridos por otras garrapatas para iniciar nuevamente el ciclo de vida (Uilenberg, 2006; Mosqueda *et al*., 2012). El ciclo de vida de *Babesia bovis* se resume en la Figura 2.1.

Ciclo de vida de *Babesia bovis*

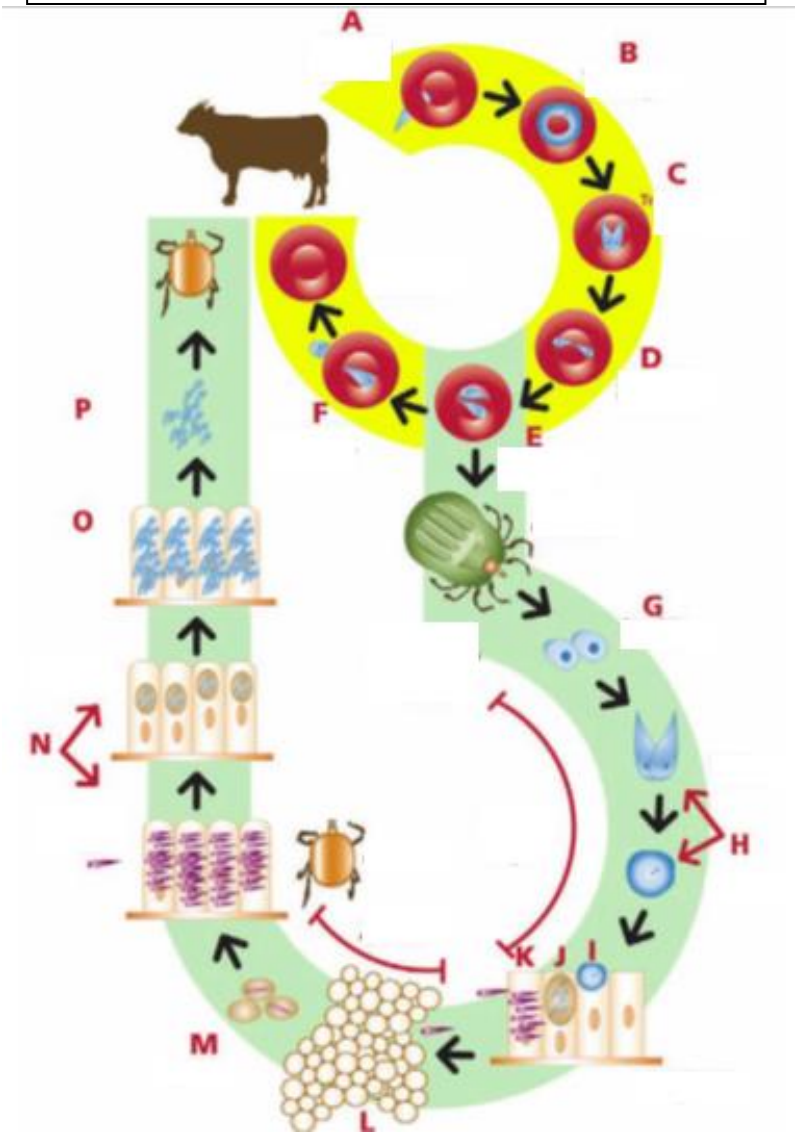


Figura 2.1 Ciclo de vida de *Babesia bovis.* **A)** Los esporozoitos B. bovis invaden un eritrocito y se transforma en un trofozoitos. **B)** El trofozoite en forma de anillo. **C)** Dos merozoitos son generados a partir de cada trofozoito por fisión binaria. **D)** Los merozoitos están inicialmente unidos parecido a dos peras en un ángulo agudo. **E)** Los merozoitos maduros se separan antes de escapar del eritrocito. **F)** Los merozoitos son liberados del eritrocito. Algunos de ellos van a invadir eritrocitos nuevos y se desarrollan en trofozoitos, mientras que otros serán recogidos por las garrapatas adultas para continuar su ciclo en el hospedador invertebrado. **G)** Etapas sexuales son liberados de las células rojas de la sangre en el lumen intestinal de la garrapata y se desarrollan a gametocitos. **H)** Los gametocitos se transforman en gametos masculinos y femeninos que forman un cigoto después de la fusión. **I)** El cigoto se convierte en etapa infectante y penetra en las células intestinales de garrapatas. **J)** Se forman los kinetos móviles. **K)** Los Kinetos destruyen las células intestinales, escapan a la hemolinfa y se distribuyen en los diferentes tipos de células y tejidos, incluyendo los ovarios. **L)** En el ovario, las células embrionarias están infectadas por transmisión transovárica (kinetos). **M)** Cuando la garrapata hembra pone sus huevos, los embriones ya están infectados. **N)** Las larvas infectadas se adhieren a un bovino y los kinetos migran a las glándulas salivales de la garrapata, donde forman un esporoblasto. **O)** Miles de esporozoitos se desarrollar a partir de un esporoblasto. **P)** Las larvas se alimentan de la sangre de bovino y los esporozoitos son liberados con la saliva en el sistema circulatorio del animal (Mosqueda et al., 2012).

Transmisión

La infección ocurre cuando los estadios de las garrapatas se alimentan del bovino, es decir, ninfa y adulto en *B. bigemina* y larva en *B. bovis.* Una vez en el torrente sanguíneo, el parásito penetra en los eritrocitos, se multiplica y se disemina a otros eritrocitos, hasta que otra garrapata se alimenta del bovino infectado (Solorio y Rodríguez, 1997; USAHA, 2008). También ocurre una transmisión transovárica en la que Babesia infecta los embriones de la garrapata, pasando así a la siguiente generación.

Periodo de incubación

El periodo de incubación de la babesiosis va de los 8 a los 10 días, incluso puede ser más largo, en tanto, el periodo de prepatencias puede resultar más corto de 3 a 6 días hasta la presentación de la parasitemia. La babesiosis causada por *B. bigemina* puede tener un periodo de incubación de 4 a 5 días (Quiroz, 1990; Cordero *et al*., 2001; Barros y Fighera, 2008).

Patología

La patología que muestran los animales infectados va a depender de la especie de *Babesia* que los esté afectando. Mientras que con *Babesia bovis* muestran fiebre elevada, ataxia, anorexia, letargia, anemia, y en ocasiones llegan a mostrar hemoglobinuria y signos nerviosos cuando la infección ya está avanzada (Callow y Mc Gavin, 1963; Quiroz, 1990; Bock *et al*., 2004), n la infección con *Babesia bigemina* muestra fiebre, anemia y hemoglobinuria. Sin embargo la OIE (2010) menciona que *Babesia bovis* es más patógena que *Babesia bigemina*, y también es la más difícil de diagnosticar, ya que, por ejemplo, en *Babesia bovis* la parasitemia sólo llega a alcanzar el 1% de los eritrocitos infectados en tanto que con *Babesia bigemina* puede incluso superar el 10% de los eritrocitos infectados. Esto es porque *B. bovis* se adhiere al endotelio vascular, lo que la hace difícil de eliminar por el sistema inmunitario y también difícil de detectar en frotis sanguíneos.

Lesiones post mortem

Las mucosas se encuentran pálidas y se pueden encontrar ictéricas. La sangre puede tener aspecto acuoso. El bazo presenta hiperplasia con consistencia pulposa y friable, así mismo, presenta un color oscuro. El hígado de igual manera puede estar agrandado con coloración oscura. La vesícula biliar se presenta distendida, con contenido espeso y granular. Los riñones pueden tener una tonalidad roja a oscura. La vejiga se puede encontrar con orina rojiza (USAHA, 2008; OIE, 2010). Los pulmones pueden presentar edema. El corazón y el cerebro pueden presentar petequias, pueden estar congestionados, incluso el cerebro pude presentar coloración rosada (Cordero *et al*., 2001; USAHA, 2008).

Diagnóstico

El diagnóstico que se utiliza más frecuentemente es el frotis sanguíneo, en el cual mediante tinciones como, Giemsa, Wright, Leishman o azul de metileno se pueden observar merozoitos intraeritrocíticos. Otro tipo de análisis que se llega a utilizar es la impronta de cerebro, el cual es útil para identificar *B. bovis* ya que las parasitemias de esta especie son muy bajas (Quiroz, 1990; Mosqueda, 2012).

De igual forma, hay diagnósticos indirectos muy útiles y que utilizan fundamentos inmunológicos. Tal es el caso de la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) que utiliza como antígeno a los eritrocitos parasitados y detecta anticuerpo contra el patógeno en bovinos expuestos. El Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), que utiliza antígenos totales o fracciones antigénicas (Janeway, 1999; Goncalves *et al.,* 2001).

Otro diagnóstico indirecto que se utiliza es el llamado PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), este método consiste en amplificar secuencias específicas de DNA del agente infeccioso, a partir de muestras de sangre del bovino o muestras de garrapatas infectadas (Weiss, 1995 y Cao *et al*., 2012).

Tratamiento

Se han utilizado una gran variedad de fármacos para eliminar al agente infeccioso, sin embargo, en la actualidad solo a algunos se les sigue comercializando. El diaceturato de diminazeno y dipropionato de imidocarb son los más utilizados; el diaceturato de diminazeno es útil contra *B. bovis* y *B. bigemina* a una dosis de 3.5 mg/kg IM. El ganado queda protegido de 2 a 4 semanas. El dipropionato de imidocarb se utiliza por vía subcutánea a una dosis de 1.2 mg/kg y también genera protección de 2 a 4 semanas tanto para *B. bovis*, como para *B. bigemina* (Cordero *et al*., 2001).

Tratamiento preventivo

Para la prevención de la enfermedad se han utilizado varios métodos, incluyendo el control de las garrapatas que son las responsables de transmitir al protozoario de un bovino a otro. Uno de los métodos es la rotación de potreros, que tiene la finalidad de evitar que los bovinos estén al alcance de las garrapatas y rompan sus ciclo de vida, otro es la vigilancia de la movilización de los animales que se encuentran en regiones con garrapatas a regiones libre (Mosqueda *et al*., 2004; Figueroa, 2006). Entre los tratamientos químicos se encuentran los organofosforados, aunque desde 1981, se reconocieron las primeras poblaciones de garrapatas resistentes en México (Solorio y Rodríguez, 1997). Otros productos químicos que se utilizan en México son: los piretroides, las amidinas, las endectocidas, las fenilpirazolonas y los inhibidores del desarrollo (SAGARPA, 2012). Otro método de prevención de la babesiosis bovina son las diversas vacunas que se han elaborado, algunas con parásitos muertos, mismas que no han mostrado una eficacia importante y otras vacunas con parásitos vivos atenuados pero que tienen el riesgo de transformarse en virulentas o es posible que al elaborar las vacunas contengan otros patógenos contaminantes. También se han probado vacunas con parásitos irradiados, pero que han tenido diferentes resultados (Callow *et al*., 1997; Jenkins, 2001; Homer, *et al*., 2002; Mosqueda *et al*., 2007).

En la actualidad se cuentan con nuevas técnicas y herramientas como son: los cultivos celulares, la genómica, la proteómica y la transcriptómica, las cuales, tienen el potencial de ayudar a diseñar nuevos tipos de vacunas (Suárez y Noh, 2011; Marcelino *et al*., 2012). Las llamadas vacunas recombinantes, las cuales están elaboradas con proteínas seleccionadas que tienen características inmunogénicas que les permiten montar una respuesta inmunológica adecuada para conferir protección a los animales (Homer, *et al*., 2002; Miller, 2012). Y se han venido descubriendo diferentes antígenos con características tales que podrían ser candidatos vacunales en *Babesia* como lo son AMA-1, las RAP-1,

SBP-1, SBP-2, SBP-3 y SBP-4. Estas proteínas se han localizado en los organelos de complejo apical como se ilustra en la Figura 2.2. Las características de los diferentes antígenos se resumen en el Cuadro 2.1, en donde se incluyen su función y su localización (Ruef *et al*., 1999),

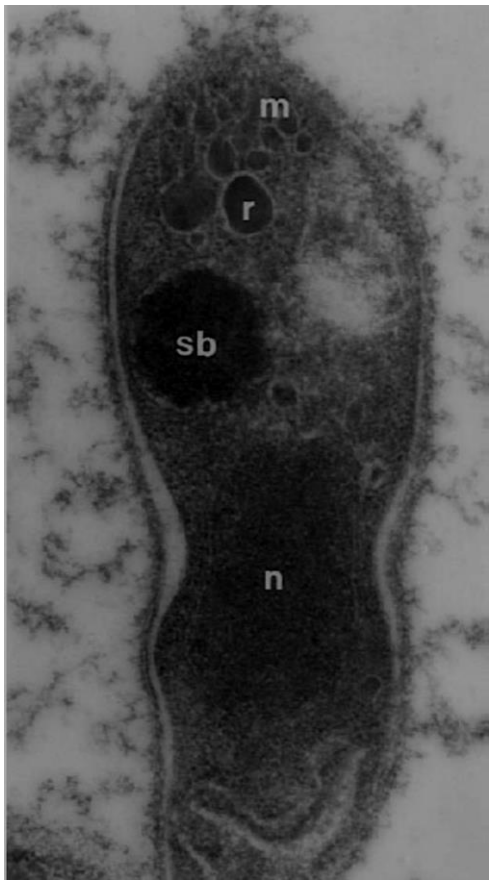


Figura 2.2. Fotografía de microscopia electrónica de un merozoito de *Babesia bovis* indicando los organelos del complejo apical. (m) micronemas, (r) roptrias, (sb) cuerpos esféricos y (n) núcleo (adaptado de Dowling *et al*., 1996).

Cuadro 2.1. Antígenos de *Babesia bovis* y *B. bigemina* caracterizados a la fecha.

Molécula/ parásito	Funciones	Fase-localización	Referencias
RAP-1, *B. bovis*, RAP-1 a, b, c *B. bigemina.*	Unión a eritrocitos, Invasión-neutralización sensible; péptido señal; inmunodominante; conservado; epítopo de superficie expuesto.	En sangre y estadios en garrapata, roptrias-merozoitos y esporozoitos, superficie, patrón puntiforme.	Suarez *et al*. 1991, 1993, 1998, 2003, Dalrymple *et al*. 1993, Yokoyama *et al*. 2006 and Mosqueda *et al*. 2002a,b.
BboRhop68, *B. bovis*	¿Función post-invasión?, dominios trans-membrana, inmunogénico.	Fases en la sangre: merozoito intraeritrocítico, trofozoitos.	Baravalle *et al*. 2010.
RAP-1 antígeno relacionado (RRA) *B. bovis*	¿Roptria? ¿Invasión? Péptido señal, neutralización sensitiva, subdominio de baja expresión.	¿roptria? merozoitos	Suarez *et al*. 2011 and Brayton *et al*. 2007.
VMSA: MSA-1, MSA-2, a, b, c de *B. bovis* Gp45 de *B. bigemina*	Reconocimiento y ataque al eritrocito, sensible neutralización, péptido señal, inmunodominante, variable (MSA2c más conservada), GPI de anclaje, glicosilada.	Fases en sangre y garrapatas: merozoitos, esporozoitos, superficie expuesta; merozoitos, esporozoitos.	Hines *et al*. 1989, 1992, 1995a,b. Suarez *et al*. 2000, Jasmer *et al*. 1992a, Florin-Christensen *et al*. 2002 and Fisher *et al*. 2001.
Bb-AMA-1; BbTRAP *B. bovis*, Bb-AMA-1 *B. bigemina*	¿Invasión?, sensible neutralización, conservado, inmunogénico, péptido señal, dominio d trans-membrana.	¿micronemas?¿secretada?	Gaffar *et al*. 2003a,b and Torina *et al*. 2010.
Spherical body proteins SBP-1, 2, 3, 4	¿Vacuola parasitófora? ¿adquisición de nutrientes? Inmunogénicas.	Cuerpos esféricos, citoplasma del eritrocito, merozoito.	Hines *et al.* 1995a,b, Dowling *et al.* 1996, Jasmer *et al.* 1992b y Terkawi *et al*. 2011.
Bbo-MIC-1 *B. bovis*	Reconocimiento celular, ¿Adhesión e invasión? sensible neutralización, dominios de unió de ácido siálico.	Etapas en la sangre; ¿micronemas?, merozoitos.	Silva *et al.* 2010.
Bbo-6cys A, B, C, D, E, F, *B. bovis*	¿Fases de desarrollo sexual?, sensible neutralización, conservado, inmunogénico.	Bbo-6cysF; etapas en la sangre, ¿parásitos en estadios sexuales?	Silva *et al.* 2011.
Large multigene families (vesa, smorfs) *B. bovis*	Infección persistente, evasión, variación antigénica, secuestro de eritrocitos infectados,	Etapas en sangre: superficie de eritrocitos infectados (VESA), y desconocidos (smorfs).	Allred 2001, Allred and Al-Khedery 2006, Al-Khedery and Allred 2006 and

			Brayton *et al*. 2007.
Bov57 *B. bovis*, T. (B.) *equi, B. bigemina*	Sinténico al antígeno protector p67 de *T. parva*, conservado.	Etapas en sangre y garrapatas: merozoitos y esporozoitos.	Freeman *et al.* 2010.
Bovipain-2, B*. bovis; B. bigemina*?	Conservado, inmunogénico, ¿nutrición?	Estadios en sangre: citoplasma de B*. bovis* y de eritrocitos infectados.	Mesplet *et al*. 2010.

(Adaptado de Suárez y Noh, 2011)

Expresión de proteínas

Clonación del DNA mediante métodos de DNA recombinante

El DNA recombinante es cualquier molécula de DNA compuesta de secuencias derivadas de otras fuentes diferentes a las original. Y la clonación del DNA recombinante permite obtener gran cantidad de moléculas idénticas. Para lograr esto, el fundamento se basa en la unión de una molécula de DNA de interés a un vector de clonación. Esa molécula de DNA clonada puede ser replicada en una célula huésped obteniendo gran cantidad de material recombinado (Lodish *et al*, 2008).

Enzimas de restricción y ligasas de DNA

Las enzimas de restricción son endonucleasas producidas por bacterias, que reconocen secuencias de 4 a 8 pares de bases, denominados sitios de restricción. Los sitios de restricción son secuencias palindrómicas cortas, es decir, se leen de la misma manera de 5´-3´que de 3´-5´, y es el lugar en donde las enzimas van a realizar el corte. El corte de las enzimas pueden ser de dos maneras un corte adhesivo o un corte romo, en el corte adhesivo quedan fragmentos colgantes en donde se pueden insertar secuencias de DNA complementarias, y en el corte romo no existen fragmentos colgantes (Lodish *et al*, 2008).

Las ligasas de DNA son enzimas que al contrario de las enzimas de restricción, se utilizan para unir fragmentos cortos de DNA mediante enlaces fosfodiéster 3´- 5´. La DNA ligasa del bacteriófago T4 tiene la capacidad de ligar extremos romos, sin embargo, la unión con extremos romos es ineficiente, por lo que requiere mayor cantidad de DNA y de ligasas (Lodish *et al*, 2008).

Vectores de clonación

Plásmidos. Son moléculas circulares de DNA bicatenario, estas moléculas están separadas del DNA cromosómico de la células. Se encuentran en bacterias y en muy pocas células eucariotas. El DNA plasmídico es duplicado durante la división celular al igual que el DNA cromosómico. Los plásmidos más utilizados son los de *E. coli* ya que han sido manipulados para ser usados como vectores de clonación. A estos vectores se les han agregado 3 regiones de importancia: un sitio de replicación (ORI), un marcador que permite la selección (por lo general un gen de resistencia a fármacos) y un sitio que permite la inserción de un fragmento de DNA exógeno (Tagu y Maussard, 2006; Drago y Sainz, 2006). Los plásmidos permiten la inserción de secuencias pequeñas que van desde los 50pb hasta secuencias grandes cercanas a las 20kb, incluso con buen tratamiento los plásmidos pueden llegar a aceptar secuencias más grandes que el mismo plásmido. Y para hacer más eficientes a los vectores, se les puede agregar un *polylinker* que es una secuencia que contiene varios sitios de restricción, diferentes a los que se encuentran en el resto del vector, lo que permite utilizar enzimas de restricción para cortar el plásmido, y poder insertar secuencias, o como análisis de las células que se trasformaron (Cseke, 2004; Drago y Sainz, 2006; Lodish *et al*, 2008).

Expresión recombinante de proteínas

La expresión de proteínas en sistemas heterólogos utilizando herramientas de biotecnología se denomina recombinante debido a que el proceso

de recombinación es necesario para lograr este objetivo. Existen varios promotores que se agregan a los vectores mismos que permiten la expresión de las proteínas heterólogas. El más utilizado de ellos es el promotor *lac* cuya expresión se regula por el isopropil-b-D-tiogalactopiranósido (IPTG). Sin embargo, debido al elevado costo del IPTG, se emplea otro promotor, el *trp* que se regula con la adición de triptófano (mediante el operón del trp) y que puede inducir la expresión incluso sin este elemento (Sambrook y Russell, 2001; Drago y Sainz, 2006, Sinah *et al.,* 2012). Otro tipo de promotor que ha resultado exitoso es el T7 que es insertado en el operón *araBAD* y que es regulado por azúcares como la L-arabinosa y la glucosa (Lee, 1980; Lee *et al.,* 1987).

La Proteína de los Cuerpos Esféricos 4 (SBP-4)

La proteína de los cuerpos esféricos 4 (SBP-4) es uno de los últimos antígenos que se han identificado en las especies de *Babesia.* Es una proteína secretada, producida por los cuerpos esféricos de los merozoitos y que se transloca al citoplasma de los eritrocitos parasitados.

La secuencia del gen que codifica a esta proteína fue identificada inicialmente en la cepa Texas de *Babesia bovis*, tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 1119 pb y de cuya secuencia fue predicha una proteína de 372 aminoácidos. Esta proteína se encontró que no tenía ninguna similitud con ninguna otra de los miembros de la familia Apicomplexa, únicamente se identificó una muy tenue homología con una proteína identificada en *B. bigemina (*Alaa *et al*., 2011a).

A esta proteína se le han hecho análisis de identidad en cepas de varios países (México, Mongolia, Ghana, Brasil y Tailandia) en los que se ha encontrado una alta similitud que va de los 96 al 100%. De igual forma, se han realizado experimentos en los que se ha clonado la secuencia de *sbp-4* en un vector pGEX-4T-1, posteriormente fue expresada en la bacteria *Escherichia coli* DH-5,

purificada e inoculada en ratones para obtener anticuerpos y su posterior análisis por medio de SDS-PAGE y Western blot (Alaa *et al*., 2011a, Alaa *et al*., 2011b, Alaa *et al*., 2011c., Altangerel, 2009). A partir de esto, con suero de bovinos infectados con *B. bovis* se realizaron pruebas de inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal, para identificar la localización subcelular de la proteína y la etapa del ciclo en la que se expresa esta proteína, como se muestra en la Figura 2.3 (Alaa *et al*., 2011a).

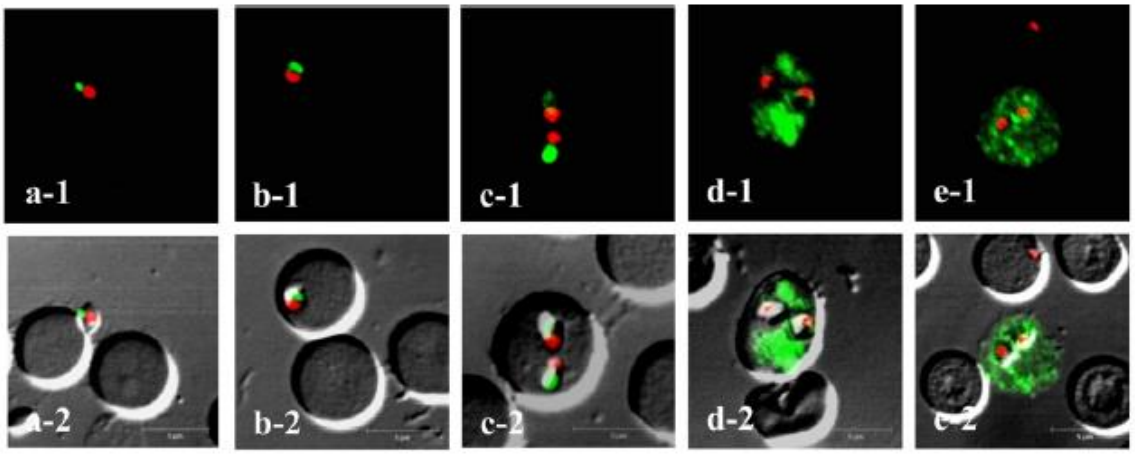


Figura 2.3. Localización celular de BbSBP-4 por microscopia laser confocal. Los frotis sanguíneos infectados con *B. bovis* se fijaron con una solución que contenía 95% metanol y 5% acetona y se tiñeron con anticuerpos específicos (a-e). Tinción con anticuerpos anti-rBbSBP-4 (verde) y tinción nuclear con yoduro de propidio (rojo). Reactividad de anticuerpos anti-rBbSBP-4 con merozoitos libres (a), etapa de anillo (b), formas en división (c), formas tardías en división (d), ruptura de los eritrocitos infectados (e). Panel 1. Imagen de BbSBP-4 (verde) tinción nuclear (roja). Panel 2. Imagen BbSBP-4 (verde) tinción nuclear (roja) en las imágenes de contraste de fases de los parásitos (Alaa *et al*., 2011a).

Pruebas como estás han podido sugerir algunas funciones de SBP-4 como son: estabilización del ambiente dentro del eritrocito para su supervivencia y desarrollo, permitir la absorción de nutrientes del eritrocito con facilidad por la estabilización del ambiente intracelular, transformar la membrana de los eritrocitos, es decir, al citoesqueleto de los eritrocitos, lo que permite adherirse al endotelio de los vasos sanguíneos y evitar que estos sean destruidos en el bazo, lo que permite su posterior liberación una vez realizada su división celular (Alaa *et al*., 2011a).

También se ha podido evaluar el uso de este antígeno como método de diagnóstico. Por ejemplo, los antígenos MSA-2c, RAP-1/CT, TRAP-T, SBP-1 y SBP-4 de *B. bovis* fueron expresados de forma recombinante en sistemas heterólogos, resultando SBP-4 como la más sensible y especifica de detectar anticuerpos de bovinos infectados mediante una prueba de ELISA con valores de 94.43% y con un 85.3% comparada con la prueba de inmunofluorescencia, por lo que se ha usado en estudios de campo en Sudáfrica para diagnosticar la enfermedad (Alaa *et al*., 2011c). A la fecha no se sabe nada de la existencia del homólogo de SBP-4 en *B. bigemina*.

III. HIPÓTESIS

La proteína de cuerpos esféricos 4 (SBP-4) de *Babesia bigemina* se expresa en un sistema bacteriano de manera recombinante.

Objetivo general

Obtener de forma recombinante la proteína de los cuerpos esféricos 4 de *Babesia bigemina*.

Objetivos específicos

1. Extraer DNA de *Babesia bigemina.*
2. Amplificar el gen *sbp4* mediante PCR.
3. Clonar el gen *sbp4* en un vector bacteriano.
4. Expresar la proteína SBP-4 en un sistema bacteriano.

IV. METODOLOGÍA

Área de estudio

El trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Veterinaria y en el laboratorio de Inmunología y Vacunas, ambos de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Autónoma de Querétaro.

Material y equipo

El material y equipo utilizados en los experimentos se enlistan en el apéndice I.

Métodos

Método para extraer DNA de garrapatas infectadas con Babesia bigemina

La extracción de DNA de *Babesia bigemina* se realizó a partir de garrapatas infectadas utilizando un método de fenol-cloroformo-alcohol iso amílico, que es similar al descrito por Mosqueda (2010), con las siguientes modificaciones:

1. Se utilizaron 2 garrapatas adultas sin eviscerar.
2. Se maceraron con un mortero y pistilo a -20C en búfer de lisis.
3. Una vez maceradas, se colectaron 600µl de la mezcla en tubos de 1.5 ml.
4. Para precipitar el DNA de la fase acuosa se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó incubando a -70°C 2 horas.
5. Después de la incubación con etanol absoluto frío, se centrifugaron las muestras a 16000rpm x 30 minutos a 4°C.
6. El DNA se disolvió en 50µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó en un Nanodrop.

7. Para comprobar la integridad del DNA cuantificado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% y se corrió por 50min a 75V. Se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio con luz UV.

Método para amplificación del gen sbp4 de B. bigemina

Con el DNA obtenido en la extracción, se realizó una reacción de PCR, para lo cual, se utilizaron oligonucleótidos (Cuadro 4.1) pre-diseñados, con las indicaciones que se mencionan en el manual del kit de clonación (Invitrogen, 2006), y la reacción que se preparó para la PCR se muestra en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.1. Oligonucleótidos para amplificación del gen *sbp4.*

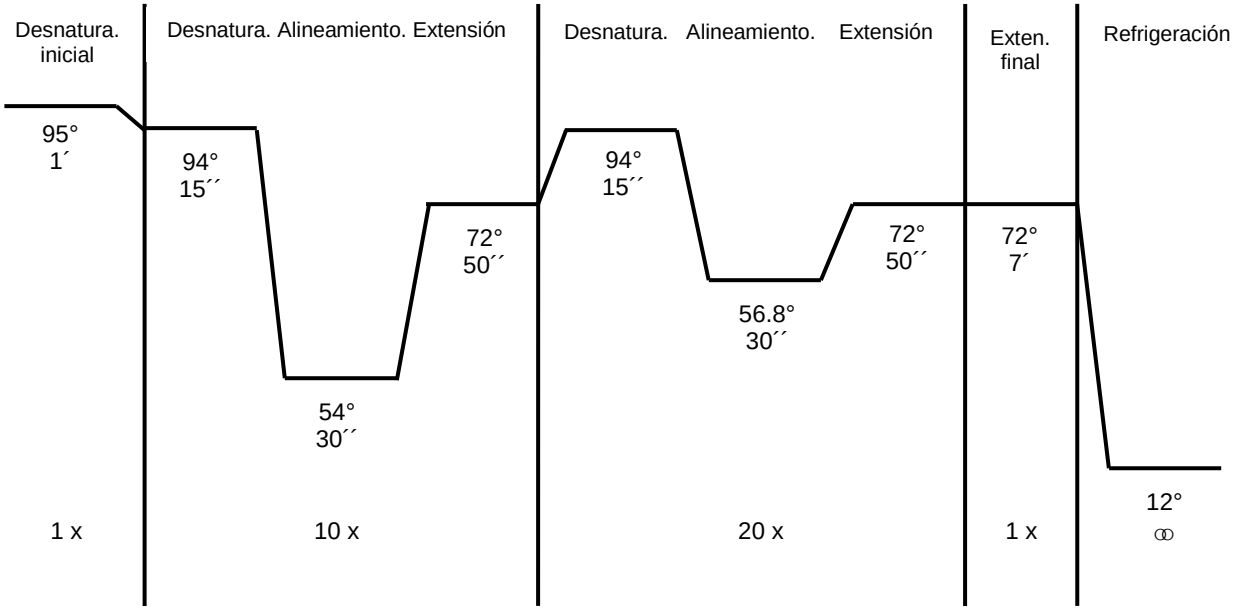
Oligonucleótidos	Secuencia
Forward	5´-CAC CTT TGA CAA CGT CAT CGA GGT GA-3´
Reverse	5´-TCA CTG GTG CTC CTC AAC CTC-3´

Cuadro 4.2. Protocolo para la reacción de PCR.

Reactivo	**Tubo 1**	**Tubo 2**	**Control -**
Master Mix	12.5µl	12.5µl	12.5µl
Primer SBP4FSPS	1µl	1µl	1µl
Primer SBP4R	1µl	1µl	1µl
Agua libre	6.5µl	6.5µl	10.5µl
DNA *B. big*	4µl	4µl	-
total	25µl	25µl	25µl

Una vez preparada la reacción, se colocaron las muestras en el termociclador y se seleccionó el siguiente protocolo de ciclado (Figura 4.1).

Figura 4.1 Diagrama de termociclado para amplificar el gen *sbp-4.*



Posteriormente se realizó la electroforesis, en gel de agarosa al 1% en TAE 1x; y se corrió a 55V durante 50 minutos. Al observar la banda deseada, el producto de PCR se purificó mediante el método descrito en Promega (2010, Part #TB308). En la cuantificación del producto se obtuvo una cantidad aproximadamente de 30ng/µl.

Método para la clonación del gen sbp4 de *B. bigemina*

Una vez purificado el producto de PCR se continuo con la clonación del gen *sbp4* en el plásmido bacteriano llamado pENTR™ D-TOPO® (Figura 4.2). Para lo cual se siguió el protocolo indicado en el manual (Invitrogen, 2006), y en

seguida se enumeran anotaciones importantes durante el desarrollo de la clonación.

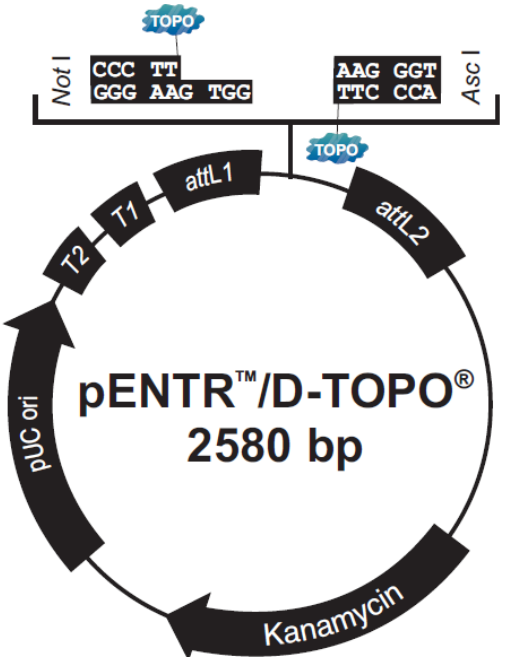


Figura 4.2. Características del vector pENTR™ D-TOPO®. **1)** *rm*B T2 secuencia de terminación de transcripción: bases 268-295. **2)** *rm*B T1 secuencia de terminación de transcripción: bases 427-470. **3)** Sitio del cebador forward M13 (-20): bases 537-552. **4)** *att*L1: bases 569-668 (c). **5)** TOPO® sitio de reconocimiento 1: bases 680-684. **6)** Sitio colgante: bases 685-688. **7)** TOPO® sitio de reconocimiento 2: bases 689-693. **8)** *att*L2: bases 705-804. **9)** T7 promotor/sitio del cebador: bases 821-840 (c). **10)** Sitio del cebador reverso M13: bases 845-861. **11)** Gen de resistencia a Kanamicina: bases 974-1783. **12)** Origen pUC: bases 1904-2577. (c): secuencia complementaria (Invitrogen, 2006).

Anotaciones durante el desarrollo del protocolo para la clonación del gen *sbp4*:

1. La reacción de ligación (Cuadro 4.3) se dejó incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se incubó toda la noche a -20°C.

Cuadro 4.3. Reacción de ligación con producto de PCR fresco.

Producto de PCR fresco	10 ng (2µl)
Solución salina	1µl
Diluyente de solución salina	-
Agua estéril	2µl para volumen de 5µl
Topo vector	20 ng (1µl)
Volumen final	6µl

2. Con la reacción de ligación, se trasformaron células One Shot® TOP10 (trasformación eficiente 1 x 10^9 ufc/µg de plásmido) al agregarles 2µl de la reacción y se dejaron incubar en hielo durante 30 minutos.

3. Con las bacterias transformadas, se realizaron 2 cultivos en placas de medio LB con kanamicina [50µg/ml], en una placa se vertieron 200µl y en la segunda placa se vertieron 100µl.

4. Para el análisis de las 7 colonias obtenidas se les purificó el DNA plasmídico, siguiendo el protocolo del kit illustra plasmidPrep mini spin (GE Healthcare, 2008), y se cuantificó el DNA purificado.

5. Una vez obtenido el DNA plasmídico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (55v x 50min), y por medio del tamaño molecular se identificaron y seleccionaron los plásmidos que contenían el inserto.

6. La confirmación de las colonias que salieron positivas a la presencia del inserto mediante electroforesis, se les realizó una digestión con enzimas de restricción. Las enzimas que se utilizaron fueron Not I y Asc I (Cuadro 4.4). La digestión enzimática se realizó de la siguiente forma: se colocó en un vial 1.5mg de DNA plasmídico aproximadamente, se le agregaron las enzimas de restricción, un amortiguador de pH, se completó la

mezcla con agua libre de nucleasas y se dejaron en incubación 1 hora a 37°C.

Cuadro 4.4. Protocolo para la reacción de restricción.

ADN plasmídico purificado	5µl [320ng/µl]
NE búfer 4 de ASC I	2µl
Enzima NOT I	1µl
Enzima ASC I	0.5µl
Agua libre de nucleasas	11.5µl
Volumen total	20µl

7. Posterior a la digestión se realizó nuevamente una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con la finalidad de observar el inserto liberado del plásmido.

8. Ya confirmada la presencia del gen *sbp4,* se mandó a secuenciar el DNA plasmídico de la colonia positiva a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, esto para corroborar que la secuencia se encontraba en marco de lectura y sin mutaciones.

9. El resto del DNA plasmídico se almacenó a -20 °C.

Método para la expresión recombinante de la proteína SBP4

Para la expresión de la proteína SBP4 se siguió el protocolo de pDEST 17^{TM} vector (Invitrogen, 2012), sin embargo, se realizaron algunas modificaciones que se mencionan a continuación.

1. La reacción de recombinación se realizó con los siguientes valores (Cuadro 4.5), utilizando como control de la recombinación el vector pENTR-gus y el pDEST™ como vector de expresión (Figura 4.3).

Cuadro 4.5. Reacción de recombinación.

Componentes	Muestras (colonia 6)	Control +
Clona de entrada (50-150ng/reacción)	4µl	-
Vector de destino (150ng/µl)	1µl	1µl
pENTR^{tm}-gus (50ng/µl)	-	2µl
TE buffer, pH 8	A 8µl	5µl

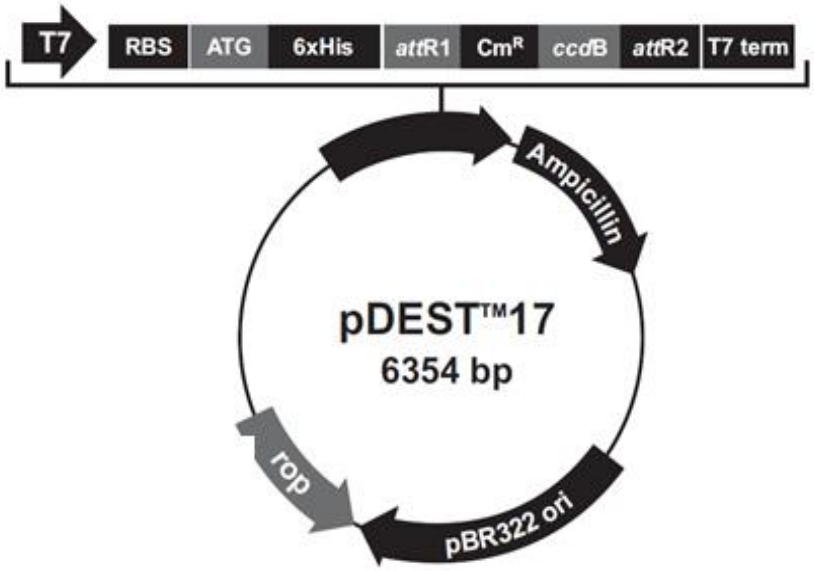


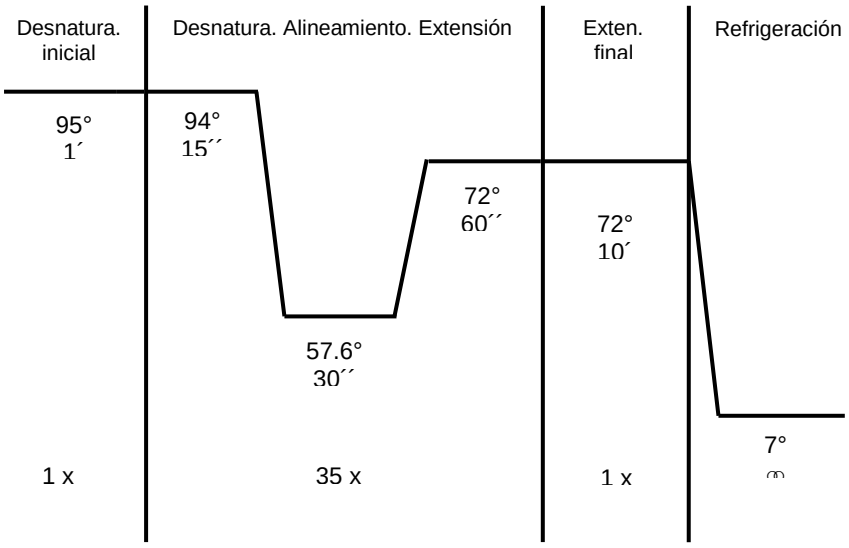
Figura 4.3. Características del vector de expresión pDEST™17. El diagrama muestra un sitio del T7 promotor, el sitio de reconocimiento de ribosomas, el iniciador ATG, la tag de histidinas, los sitios de recombinación *att*R1 y *att*R2, el gen de resistencia a cloranfenicol, el gen *ccd*B, la región de terminación de la transcripción del T7, el gen de resistencia a ampicilina, el sitio de origen pBR322 y un ROP que es el que dirige el marco de lectura.

2. Al agregar la Mezcla de Enzimas LR clonasa® II, se dejó en incubación durante 18 horas.

3. Para la transformación de células competentes DH5α^{TM} se utilizaron 2 placas de agar LB con ampicilina [100µg/ml] por cada reacción, es decir, 2 para la colonia 6 y 2 para el control. En las placas de la colonia 6 se vertieron 200 y 100 µl de muestra y de igual manera en las placas del control positivo.

4. Para el análisis de las transformantes se realizó un PCR, utilizando el primer T7 y el primer *reverse* SBP4R (Figura 4.6).

Figura 4.4. Termociclado para células DH5α trasformadas



5. Posteriormente se elaboró la trasformación de las células BL21-AI^{TM} One Shot®, como se describe en el manual (Invitrogen, 2012).

6. Se cultivaron 2 placas con agar LB con ampicilina [100µg/1ml], y se vertieron 2 volúmenes diferentes, el primero con 100µl y el segundo con 200µl, igualmente se realizó con el control pGUS.

7. Una vez obtenidas las colonias trasformadas se continuó con el protocolo del manual para realizar la inducción de la proteína.

Método para confirmación de la expresión de la proteína

En la expresión de la proteína se generaron cultivos por duplicado de las bacterias con plásmido vacío, del control de expresión pGUS y de la colonia seleccionada (6), es decir, de cada muestra se obtuvo una inducida y otra sin inducir. Y para la comprobación de la inducción se realizó primero una electroforesis de proteínas y posteriormente un Western Blot. Estos métodos se describen a continuación:

1. *Electroforesis:* Se lavaron los cristales con agua, jabón y etanol 70%.

2. Se colocaron los vidrios separadores de 0.75mm y los cristales en los *casting frame* y estos en el acrílico elaborador de geles.

3. Se les realizó la prueba de hermeticidad, colocando etanol en entre los cristales, para comprobar que no se salieran los geles.

4. Se retiró el etanol y se absorbió el resto con papel filtro.

5. Posteriormente se elaboró el gel separador (Sambrook y Russell, 2001) (Cuadro 4.6) y se colocó entre los cristales, y se le agrego isopropanol, para mantener el gel parejo.

Cuadro 4.6. Elaboración del gel separador

12% gel	cantidad
H_2O	1.6ml
Acrilamida mix 30%	2.0ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3ml
SDS 10%	0.05ml
Persulfato de amonio 10%	0.05ml
TEMED	0.002ml

6. Una vez polimerizado el gel separador se preparó el gel concentrador (Sambrook y Russell, 2001) (Cuadro 4.7), se colocó sobre el primero y se le colocó rápidamente el peine de 10 pozos.

Cuadro 4.7. Elaboración del gel concentrador

	cantidad
H_2O	0.68ml
Acrilamida mix 30%	0.17ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13ml
SDS 10%	0.01ml
Persulfato de amonio 10%	0.01ml
TEMED	0.001ml

7. Después de que terminó de polimerizar el gel se pasaron los cristales a los soportes para electroforesis vertical.

8. Posteriormente se colocaron los geles en el mini tanque y se llenó con buffer de corrida.

9. Se prepararon las muestras, a cada muestra se le agregaron 80 µl (40µl de buffer de lisis [Invitrogen, 2012], y 40µl de buffer de corrida). Se hirvieron las muestras durante 8 minutos.

10. Se retiraron los peines y se colocaron las muestras, en el primer carril se colocó el marcador de peso de proteínas (Kaleidoscope, BioRad), y posteriormente se colocaron las proteínas de: bacterias con plásmido vacío sin inducir, bacterias con plásmido vacío inducido, SBP4 (colonia 6) no inducida, SBP4 (colonia 6) inducida, control pGUS no inducido y control pGUS inducido.

11. Se corrió la electroforesis a 75volts, durante 2 horas aprox.

12. Un gel se dejó fijándose durante 30 minutos.

13. Posteriormente se le agregó el colorante Coomassie, y se dejó en agitación durante 1 hora.

14. Finalmente se dejó 30 minutos en solución desteñidora.

15. *Western Blot:* Un gel se dejó con el amortiguador de trasferencia, al igual que la membrana, las fibras y el papel filtro, durante 15 minutos.

16. Posteriormente se armó el sándwich de transferencia, en el cátodo negativo se colocó una fibra, papel filtro, el gel, la membrana de nitrocelulosa, papel filtro, la otra fibra y se cerró.

17. Se colocó en el tanque el amortiguador de trasferencia, junto con un refrigerante y un agitador, se colocó el sándwich en el soporte, posteriormente se colocó en el tanque y se corrió la transferencia a 100v durante 1 hora, sobre una platina con agitación.

18. Terminando la trasferencia, se le hace un lavado a la membrana con TBS 1x durante 15 minutos.

19. *Bloqueo:* la membrana se bloqueó con leche al 5 % en TTBS 1x toda la noche a 4°C.

20. Al día siguiente se le realizó un lavado con TTBS 1x durante 20 minutos y dos lavados con TBS 1X durante 15 minutos cada uno.

21. *Incubación con el primer anticuerpo*: se preparó el primer anticuerpo anti-his tag de conejo 1:500 en leche descremada al 1% + TTBS.

22. Se dejó en incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación (60rpm).

23. Terminada la incubación se retiró la solución del primer anticuerpo y se realizaron 3 lavados, 1 con TTBS durante 15 minutos y 2 más con TBS 1X por 15 minutos cada uno y en agitación (100rpm).

24. *Incubación con el segundo anticuerpo.* Se preparó el anticuerpo secundario anti-anticuerpo de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000) en leche descremada al 1% + TTBS.

25. Se colocó sobre la membrana y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación ligera (60rpm).

26. Terminando la incubación se retiró el anticuerpo secundario, y se realizaron 3 lavados más, 1 con TTBS y 2 con TBS, cada uno de 15 minutos y en agitación (100prm).

27. *Revelado:* se realizó por colorimetría, a la membrana se le agregó solución premezclada de BCIP/NBT (SIGMA).

28. Cuando se observaron las bandas claramente, se detuvo el revelado con agua destilada.

V. RESULTADOS

Extracción de DNA de *Babesia bigemina*

La extracción de DNA de *Babesia bigemina* se obtuvo a partir de DNA de garrapatas infectadas con *B. bigemina,* y para saber qué cantidad de DNA se extrajo se utilizó un espectrofotómetro (Cuadro 5.1). Además, lo que se hizo para confirmar la presencia de DNA integro fue una electroforesis de integridad de DNA, se observaron bandas de gran intensidad indicando DNA integro, aunque se observaron algunas muestras con degradación del mismo (Figura 5.1).

Cuadro 5.1. Cuantificación de DNA extraído a partir de garrapatas infectadas con *B. bigemina* cepa Chiapas.

Muestras	Concentración (ng/ µl)	260/280
1	491.7	1.87
2	476.3	1.91
3	518.9	1.88

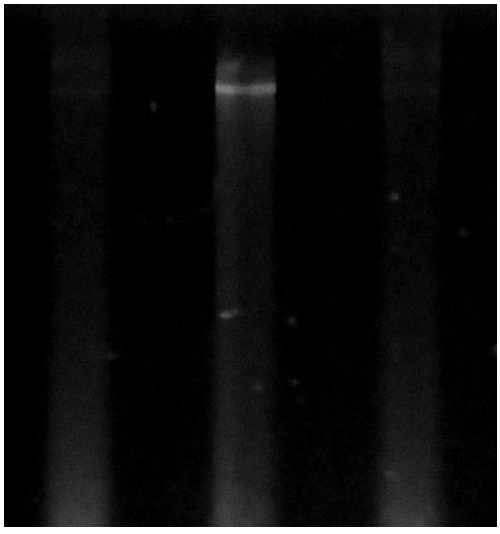


Figura 5.1. Electroforesis para evaluación de integridad de DNA extraído a partir de garrapatas infectadas con *B. bigemina* (se presentan tres muestras diferentes).

Amplificación del gen *sbp4* mediante PCR

Se utilizó el DNA extraído para amplificar el gen *sbp4* con la prueba de PCR, se usaron los oligonucleótidos y el ciclado que se describieron en la sección de metodología. La banda esperada en la electroforesis era de 800pb aproximadamente. Después de tratar el gel con bromuro de etidio y observarlo en el transiluminador se detectó una banda del tamaño esperado como se muestra en la Figura 5.2.

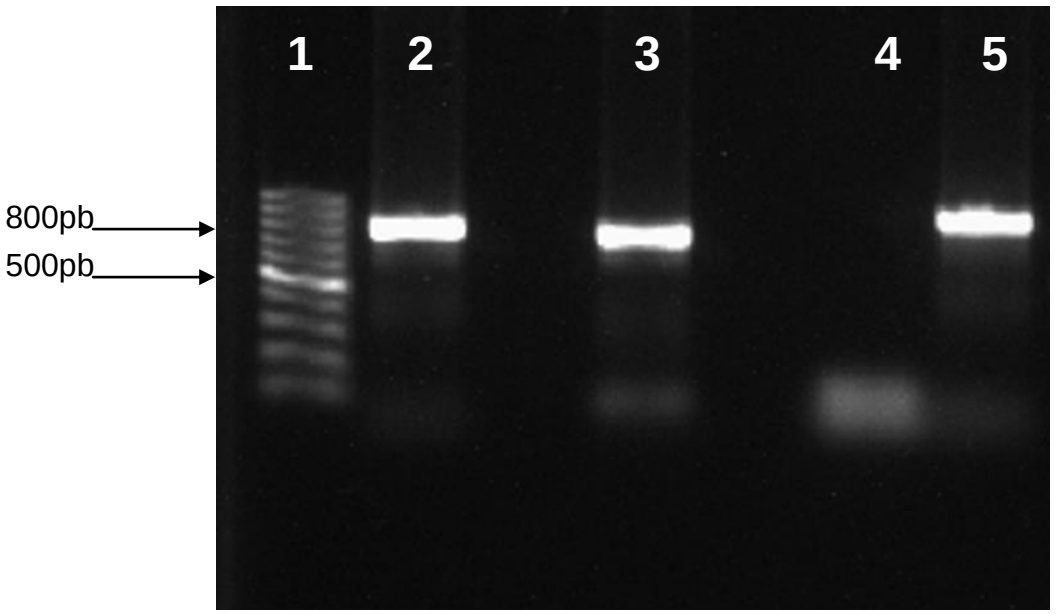


Figura 5.2. Amplificación del gen *sbp4* (774pb) a partir de DNA extraído de garrapatas infectadas con *B. bigemina.* En el carril 1 se observa el marcador de tamaño molecular (1KB), en el carril 2 se observa la muestra 1 con DNA de *B. bigemina* cepa Chiapas, en el carril 3 se observa la muestra 2 de DNA de *B. bigemina* cepa Chiapas, en el carril 4 se muestra el control de reacción negativo (sin DNA) y en el carril 5 se muestra el control positivo de reacción (DNA purificado de *B. bigemina*).

Clonación del gen *sbp4* en un vector bacteriano

Al lograr la amplificación del gen *sbp4* inmediatamente se procedió a realizar la clonación, ya que se necesitaba producto fresco de PCR para realizarla.

Siguiendo el protocolo proporcionado en el kit de clonación para el vector bacteriano, se obtuvieron alrededor de 20 ufc. De las colonias obtenidas se seleccionaron 7, las cuales se crecieron en medio LB con Kanamicina [50µg/ml], se les extrajo y purificó el DNA plasmídico, posteriormente se cuantificó y se realizó una electroforesis del DNA purificado para observar la presencia del inserto, obteniendo los resultados que se observan en la Figura 5.3.

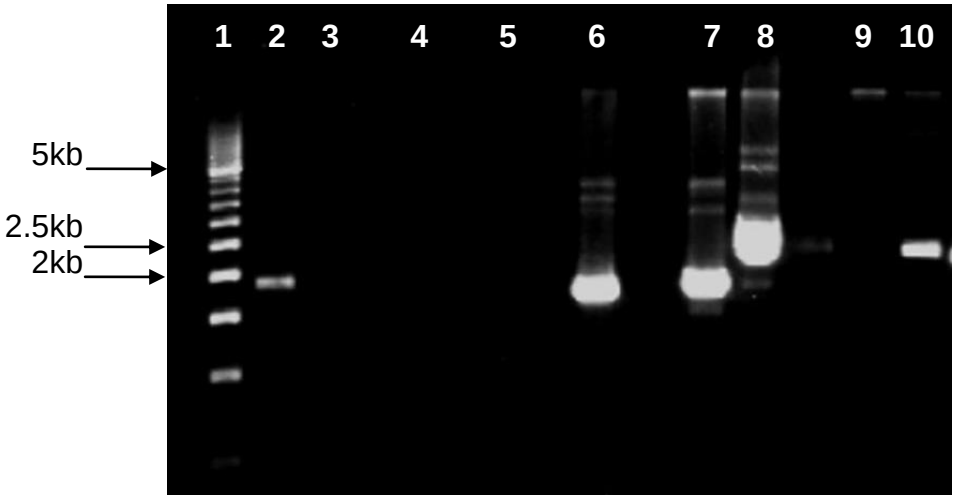


Figura 5.3. Electroforesis de DNA plasmídico purificado de colonias trasformadas con el vector de clonación pENTR^{TM}D-TOPO® (2580pb). En el carril 1 se muestra el marcador de tamaño molecular (5KB), carril 2: control negativo (plásmido sin inserto), carril 3: DNA plasmídico colonia 1, carril 4: DNA plasmídico colonia 2, carril 5: DNA plasmídico colonia 3, carril 6: DNA plasmídico colonia 4, carril 7: DNA plasmídico colonia 5, carril 8: DNA plasmídico colonia 6 (positivo a la inserción de gen *sbp4* al vector 3358pb aprox.), carril 9: DNA plasmídico colonia 7, carril 10: control positivo (vector con un inserto de tamaño aproximado al de *sbp4*).

Para confirmar la presencia del inserto en la colonia 6 positiva en la electroforesis de DNA plasmídico, se realizó una digestión enzimática con las enzimas *Not I* y *Asc I*, la digestión tenía que liberar un fragmento de 800pb es decir, del tamaño del inserto más el sitio el fragmento de la restricción, después de la incubación con las enzimas se realizó la electroforesis (55v 45 minutos) y el resultado se muestra en la Figura 5.4.

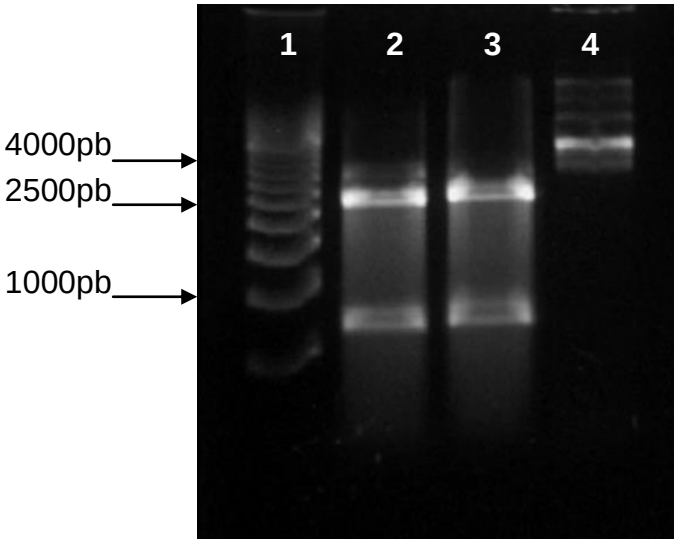


Figura 5.4. Electroforesis de la digestión enzimática con *Not I* y *Asc I.* La colonia transformada que se muestra es la número 6. En el carril 1 se muestra el marcador de tamaño molecular (5KB), carril 2: reacción 1 de la colonia 6 en donde se distinguen 3 bandas (de arriba hacia abajo), la primera más tenue corresponde a DNA plasmídico no digerido, la segunda corresponde a al plásmido sin el inserto (2500pb aprox.) y la tercer banda corresponde a *sbp4* + un fragmento del vector en donde cortaron las enzimas (800pb aprox.); carril 3: reacción 2 de la colonia 6 en donde se distinguen 2 bandas, la primera correspondiente al vector digerido sin el inserto (2500pb aprox.), la segunda banda correspondiente a *sbp4* + un fragmento del vector en donde cortaron las enzimas (800pb aprox.); y el carril 4: que muestra DNA plasmídico de la colonia 6 que no fue sometido a la digestión con enzimas y que muestra una banda de mayor intensidad correspondiente a vector junto con el inserto (3358pb).

Para comprobar que el inserto estuviera en marco de lectura y sin mutaciones, se secuenció el DNA plasmídico, y las secuencias obtenidas se analizaron con los programas BioEdit y ClustalW2 alineándolo con una secuencia conocida de *sbp4*, y en el análisis la secuencia se encontró en marco de lectura, sin mutaciones, pero sí con mutaciones de nucleótidos que no obstante eran silenciosas y no afectaban la expresión de la proteína, el resultado de la alineación de secuencias de nucleótidos se muestra en la Cuadro 5.2.

Cuadro 5.2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SBP4 de la cepa Kuttler y la cepa Cintalapa, Chiapas. En donde se comprobó que la secuencia se encuentra en marco de lectura y con una sola variación entre las dos secuencias lo que da un *score* de 99.61 de similitud.

```
ProSBP4cepaKuttler      FDNVIEVTFQEHGESDNMVLDLSIPSESDMMIHRQTDGCAPRTPVVYTPV 50
ProSBP4cepaChiapas      FDNVIEVTFQEHGESDNMVLDLSIPSESDMMIHRQTDGCAPRTPVVYTPV 50
                        **************************************************

ProSBP4cepaKuttler      RPNKLRHLVWSDTVIHGVGEDDEDTIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSTKVH 100
ProSBP4cepaChiapas      RPNKLRHLVWSDTVIHGVGEDDEDTIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSTKVH 100
                        **************************************************

ProSBP4cepaKuttler      YLGRDGEFEFISEHKYQEELREMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGI 150
ProSBP4cepaChiapas      YLGRDGEFEFISEHKYQEELREMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGI 150
                        **************************************************

ProSBP4cepaKuttler      TWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCHQRFAGASVYVNGHEKLVALI 200
ProSBP4cepaChiapas      TWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCRQRFAGASVYVNGHEKLVALI 200
                        ******************************:*********************

ProSBP4cepaKuttler      YHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAAGKNSVDAEVR 250
ProSBP4cepaChiapas      YHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAAGKNSVDAEVR 250
                        **************************************************

ProSBP4cepaKuttler      KEVEEHQ- 257
ProSBP4cepaChiapas      KEVEEHQ- 257
                        *******
```

Finalmente se realizó un análisis en el banco de proteínas de Blast, para identificar proteínas similares a la que se obtuvo después de trasformar la secuencia de nucleótidos a aminoácidos, y en este análisis se encontraron proteínas parciales reportadas en *B. bigemina* (No. de acceso AGC12829.1) y la proteína SBP4 en *B. bovis* (No. de acceso BAJ46134.1) (Cuadro 5.3).

Cuadro 5.3. Análisis Blast de la secuencias de aminoácidos de SBP4. Se muestran las secuencias de mayor porcentaje de similitud *B. bigemina* (arriba) y *B. bovis* (abajo).

Puntuación	Predicho	Identidad	Positivos	Espacios
337 bits(863)	2e-114	162/163(99%)	162/163(99%)	0/163(0%)

```
Query  47   YTPVRPNKLRHLVWSDTVIHGVGEDDEDTIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDG  106
            YTPVRPNKLRHLVWSDTVIHGVGEDDEDTIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDG
Sbjct  1    YTPVRPNKLRHLVWSDTVIHGVGEDDEDTIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDG  60

Query  107  EFEFISEHKYQEELREMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKV  166
            EFEFISEHKYQEELREMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKV
Sbjct  61   EFEFISEHKYQEELREMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKV  120

Query  167  VAGNVTVWTGVGCRQRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE  209
            VAGNVTVWTGVGC QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE
Sbjct  121  VAGNVTVWTGVGCHQRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE  163
```

Puntuación	Predicho	Identidad	positivos	Espacios
337 bits(863)	2e-114	162/163(99%)	162/163(99%)	0/163(0%)

```
Query  6    EVTFQEHGESDNMVLDLSIPSESDMMIHRQTDGCAPRTPVVYTPVRPNKLRHLVWSDTVI  65
            E   Q HG  + M L+L +P  +  ++     G A  TPV  Y P+ P KL  + WS++ I
Sbjct  8    EANVQVHGAPNAMSLNLLMPVNTHRILKTSEFGSA-HTPVHYKPLFPFKLVSVSWSESPI  66

Query  66   HGVGEDDEDT-------------------------------------IEKVTVHTHCH  86
             +   +++                                      I++V V  +C
Sbjct  67   FEIPVPEKEQGKEEKTEETETKSEEDGEEAEGADEAAPAILHADLQNKFIDEVVVFRNCF  126

Query  87   ETLIEVSLGSTKVHYLGRDGE---FEFISEHKYQEELREMTKTIVVDINDVN-DNKYLSY  142
            +T + V++   ++++     E   FE +   +Y++ + ++ KT  +DI++ +  ++ L
Sbjct  127  DTAVSVNVDGKQIYFTATGNEAEDFEEVEADEYEKFMNKIAKTFTIDISETDLKSECLVA  186

Query  143  ETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCRQRFAGASVYVNGHEKLVALIYH  202
            E +  Y ++WY+I    C+ +DKV+      +W      ++ FAG SV  +G ++L+AL
Sbjct  187  EDDKVYDLSWYSIHAAPCYLADKVLFKGNPLWEATDKKEHFAGCSVINDGDDRLIALSIR  246

Query  203  DVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEK  237
            +   ++  ++G +   E+  ++   ++  +EK
Sbjct  247  NGPENRQIYFYGVDGALREIDNDEMVTHYEAFKEK  281
```

Expresión de la proteína SBP-4 en un sistema bacteriano

Una vez que comprobamos que la secuencia de nucleótidos estaba en marco de lectura por secuenciación, se realizó la subclonación del gen *sbp4* en el vector de expresión. Para esto se transformaron dos cepas diferentes de células bacterianas: las DH5α™ que se utilizaron con la finalidad de mantener el vector de expresión y generar una genoteca, y por otro lado las células BL21-AI™ que se usaron para expresar la proteína de los cuerpos esféricos de *B. bigemina*, para esto se siguió el protocolo del kit de expresión (Invitrogen, 2012), y una vez trasformadas las bacterias BL21-AI™ se indujo la expresión agregando a los cultivos L-arabinosa y cultivándolos durante 3 horas a 37°C. Una vez cumplida la incubación se realizó el tratamiento (lisis) de las bacterias indicadas en el protocolo para poder realizar la electroforesis de proteínas. Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida y se tiño con coomassie, y el resultado que se obtuvo fue satisfactorio, ya que se observó una banda de 30kDa aproximadamente que es equivalente al peso molecular de la proteína SBP4 más la tag de 6 histidinas (Figura 5.5).

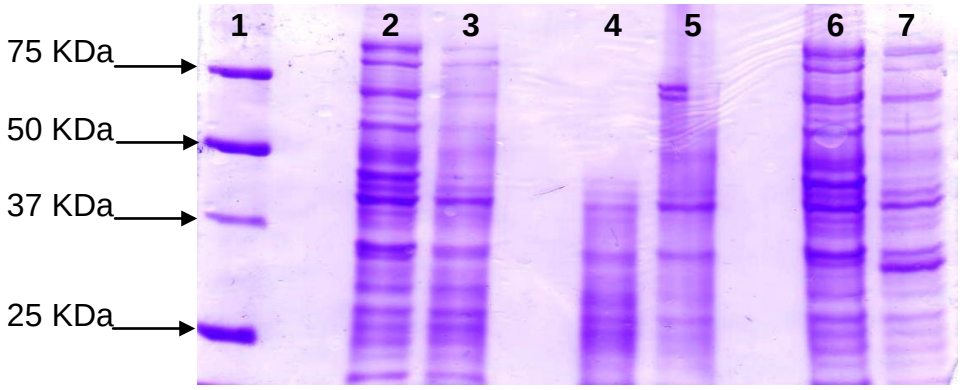


Figura 5.5. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida teñido con Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular de proteínas. Carril 2: Plásmido vacío no inducido. Carril 3: Plásmido vacío inducido. Carril 4: pENTR-gus^{TM} no inducido. Carril 5: pENTR-gus^{TM} inducido. Carril 6: colonia de BL21-AI^{TM} trasformada con el vector pDEST^{TM}17 + SBP4 no inducida. Carril 7: colonia de BL21-AI^{TM} trasformada con el vector pDEST^{TM}17 + SBP4 inducida; en este último carril se observa una banda de mayor intensidad de un peso de 30KDa aproximadamente que corresponde al peso de SBP4 (30.5 KDa).

Posteriormente para la confirmación de la expresión de la proteína se realizó la prueba de Western Blot, en la que se utilizaron dos anticuerpos, el primario anti-tag de histidinas de conejo, el cual se pegaría a una secuencia a una secuencia de 6 histidinas que contiene el vector de expresión pDEST^{TM}17 y que se expresa durante la inducción, y de la misma manera identificaría un secuencia en el control de expresión pENTR-gus^{TM}. Por otro lado el anticuerpo secundario un anticuerpo anti-anticuerpo de conejo identificaría al anticuerpo primario que es de conejo, y después de realizar el Western Blot lo que se observó se muestra en la Figura 5.6.

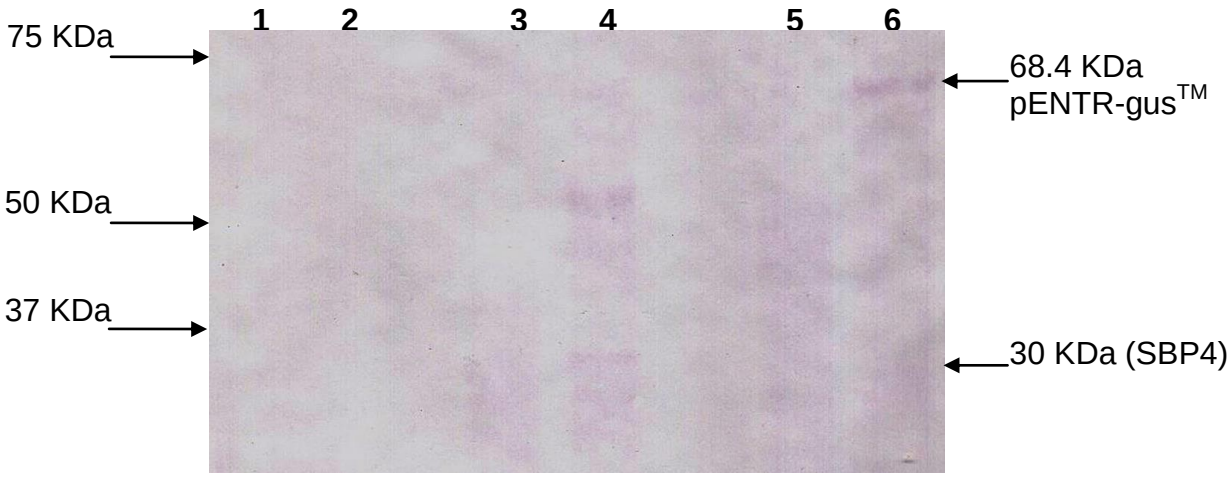


Figura 5.6. Western Blot para confirmar expresión de la proteína SBP4 de *Babesia bigemina*. Carril 1: plásmido vacío no inducido, carril 2: plásmido inducido. Carril 3: plásmido con SBP4 no inducida, carril 4: plásmido con SBP4 inducida. Carril 5: pENTR-gus™ control de expresión no inducido y carril 6: pENTR-gus™.

Y a manera de comprobación que la proteína de los cuerpos esféricos 4 de *Babesia bigemina* se expresar en un sistema bacteriano y que es reconocida por un anticuerpo anti-tag de histidinas, se realizó nuevamente el Western Blot, pero ahora sólo evaluando el lisado de bacterias que contenían la proteína SBP4 no inducida y la Inducida (Figura 5.5).

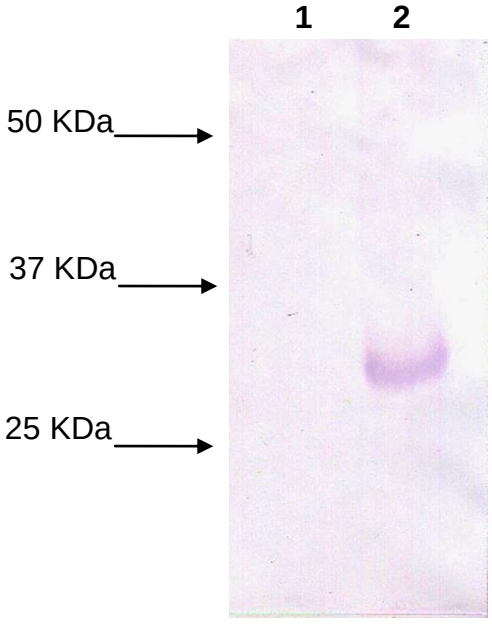


Figura 5.7. Western Blot de lisado de bacterias con la proteína SBP4 no inducida e inducida. Carril 1: plásmido con SBP4 no inducida. Carril 2: plásmido con SBP4 inducida.

VI. DISCUSIÓN

Actualmente se sabe que *B. bigemina* trascribe y expresa la proteína SBP4 que tiene homología con la proteína SBP4 de *B. bovis.* Sin embargo, no se han realizado experimentos para expresar esta proteína de forma recombinante, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue expresar de forma recombinante la proteína en un sistema bacteriano.

El primer objetivo que se trabajó fue la extracción de DNA de *B. bigemina* a partir de garrapatas infectadas utilizando el método publicado por Mosqueda (2010). Con este método se obtuvieron cantidades y purezas de material genético en proporciones adecuadas de acuerdo a lo descrito por Sambrook y colaboradores (1989) y Wassenaar (2002) que son: concentraciones mínimas de 50µg/ml para DNA de cadena doble y lectura de pureza (260/280) de 1.8 para ser detectadas por medio de la prueba de PCR.

El segundo objetivo fue amplificar el gen *sbp 4* de la cepa Cintalapa, Chiapas por medio de PCR utilizando un protocolo de ciclado con base en *primers* diseñados a partir de la secuencia de *B. bigemina*. Se logró amplificar el gen *sbp4* y cuando se analizó la secuencia de nucleótidos y se comparó con la secuencia reportada por Guillemi y colaboradores (2013) se observó un porcentaje de similitud de 99%. Cuando se evaluó la secuencia predicha de proteína y se comparó con la secuencia descrita por los mismos autores se observó un porcentaje de similitud de 99%. Con esta información podemos confirmar que el gen trabajado en este estudio es *sbp4* y que su secuencia es conservada con la secuencia reportada por Guillemi y colaboradores (2013) del gen *sbp4* de *B. bigemina* de una cepa argentina.

Para el tercer objetivo es decir, la clonación del gen *sbp4* en un vector bacteriano se siguió el protocolo de la compañía (Invitrogen, 2006). Con este protocolo se obtuvieron 5 colonias bacterianas trasformadas; Shuman (1991) y

Cheng y Shuman (2000) describieron este protocolo por primera vez, lo que coincide a lo descrito en la metodología, sin embargo, no se logró la eficiencia en el crecimiento de colonias esperado de 1 x 10^9 ufc como se indica en el kit de clonación, y esto se pudo deber a un mal tratamiento a las bacterias, mal purificación del producto de PCR que se utilizó para la ligación o una mala relación entre el producto de PCR y el vector. No obstante con las colonias obtenidas y después de su análisis por electroforesis, seguido por un análisis por digestión enzimática y finalmente por secuenciación (Sambrook y Russell, 2001 e Invitrogen, 2006) se obtuvieron los resultados esperados; se detectaron colonias bacterianas que contenían el vector con el inserto al crecerlas en un medio con kanamicina (Landy, 1989). Los resultados de la secuenciación de cada una de las clonas y el análisis posterior de las secuencias, permitió dos cosas: primero corroboró la existencia de la secuencia del gen *sbp4* y segundo, que esta secuencia estaba en marco de lectura abierto, con lo que se podía proceder con la expresión.

El cuarto objetivo de éste trabajo fue la expresión recombinante de la proteína SBP4. Para este objetivo se siguió el protocolo de un kit comercial (Invitrogen, 2012). El paso conocido como “reacción de recombinación” se logró gracias a las características biotecnológicas de los vectores, ya que cuentan con sitios específicos de recombinación llamados *att*L (vector de clonación) y *att*R (vector de expresión), los cuales hacen más eficiente el proceso y por consiguiente la expresión. La catálisis de la mezcla de enzimas LR clonasa II que contiene una integrasa, una excisionasa y un factor de integración del huésped (IHF por sus siglas en inglés), es lo que permite la recombinación de los vectores como está reportado por varios autores (Weisberg y Landy, 1983; Landy, 1989; Ptashne, 1992; Goosen y Van de Putte, 1995). Durante éste proceso únicamente se obtuvieron las UFC recombinadas, ya que la tecnología de este sistema de expresión permitió la selección de las colonias mediante el gen de resistencia a antibiótico y un gen letal llamado “*ccd*B” evitando el crecimiento de las bacterias no recombinadas y permitiendo que se desarrollara de manera más eficiente la

expresión únicamente de colonias con el gen de interés (Bernard y Couturier, 1992; Invitrogen, 2012). Finalmente para lograr expresión de la proteína exógena por las bacterias transformadas, se usó el promotor de LacZ por lo que se siguió el proceso que utilizó la L-arabinosa y cuyo principio lo describieron Ogden y colaboradores en 1980 y Schleif en 1992. Con este protocolo se obtuvieron pellets de bacterias que expresaron la proteína SBP4, esto se verificó mediante lisis celular y separación de proteínas en geles de poliacrilamida teñidos con colorante Coomasie, además de inmunolocalización mediante Western blots usando anticuerpos específicos. Estos análisis permitieron identificar una proteína de un peso aproximado de 30KDa, que corresponde a la proteína esperada y que además fue identificada con anticuerpos específicos, lo cual confirma la expresión recombinante.

VII. CONCLUSIÓN

Se expresó una proteína del tamaña molecular de SBP4 de *Babesia bigemina* de 29.4 KDa, por lo que se concluye que la proteína SBP4 de *Babesia bigemina* se expresa de manera recombinante en un sistema bacteriano. Esto comprueba la hipótesis planteada en este trabajo. Se propone seguir con experimentos que permitan la purificación de la proteína y posteriormente su evaluación como candidato vacunal y de diagnóstico contra la babesiosis bovina.

APÉNDICE

Material y equipo general

Material

- Agua destilada. Marca J. T. Baker. Cod. AG4029-4220-20.
- Cloro. Marca Great value.
- Etanol. J.T. Baker. No. de catálogo: 9014-02
- Frascos de 50ml, 100ml, 250ml, 500ml y 1L.
- Gradillas para viales de 1.5 y 0.2 ml, para tubos de 15 y 50ml. Marca Senna. No. De catálogo: para viales 3-233, para tubos 18765.
- Guantes de nitrilo. Marca Kimberly Clark. No de Catálogo: N220M
- Marcador indeleble. Marca Sharpie
- Matraces Erlenmeyer. Marca Kimax.
- Micropipeta 1-10µl. Marca Gilson
- Micropipeta 20-200µl. Marca Gilson
- Micropipeta 100-1000 µl. Marca Gilson
- Película para laboratorio. Parafilm®. No. de cat. PM-996.
- Pipetas. Marca Falcon. No de catálogo: 356550 y 357535
- Probetas. Marca Kimax.
- Puntas estériles de 1-10µl. Marca Molecular BioProducts, ART. No. Catálogo, 2139.
- Puntas estériles de 20-200 µl. Marca Molecular BioProducts, ART. No. Catálogo, 2069.
- Puntas estériles de 100-1000 µl. Marca Molecular BioProducts, ART. No. Catálogo, 2279.
- Tubos de 15 y 50 ml. Marca Nara Biotec, #NR-30215 y Marca CORNING, #430290.
- Vasos de precipitados. Marca Kimax.

- Viales de 1.5ml. Marca Molecular BioProducts, ART. No. Catálogo, 3448.
- Viales para PCR de 0.2ml. Molecular BioProducts, ART. No. Catálogo, 3412.

Equipo

- Agitador vortex. Marca Daigger, Vortex Genie 2. Cat. 22220A.
- Agitador orbital. Marca Felisa. No. de Catálogo: FE-315.
- Autoclave. Marca Felisa. No. de Catálogo: FE-397.
- Balanza analítica. Marca Sartorius. Mod. AX224. Serie M-PACT.
- Baño maría. Marca Felisa No. de Catálogo FE-371.
- Cámara de electroforesis. Marca Bio-Rad, No. de Catálogo 170-4467.
- Campana de flujo laminar. Marca Labconco No. de Cat. 3620804 DELTA.
- Campana de extracción. Marca TECNOLAB.
- Centrífuga. Marca Sorvall, Legend Mach 1.6 R. No. de Cat. 75004337.
- Congelador -20°C. Marca Frigidaire. No. de cat. FGCH25M8LW.
- Fotodocumentador. Marca Bio-Rad Doc XR Model Universal Hood, No. de Catálogo: 200902015716.
- Fuente de poder para cámara de electroforesis. Marca Bio-Rad. PowerPac™ basic No. de cat., 165-5052.
- Incubadora. Marca Felisa. No. de cat., FE-133.
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf, Centrifuga 5418, No. de cat., 22331.
- Microondas. Marca Samsung. Modelo No. MW1440WA.
- Platina. Marca CIMAREC. No. de cat., SP131325.
- Potenciómetro. Marca Hanna. No. de cat., 736-HI 2211.
- Refrigerador. Marca Mabe. No de cat., RM43S07B.BLA.
- Termociclador. Marca Bio-Rad. Mod. C1000. No. de Cat. 185-1096.

- Ultra-congelador -70°C. Marca Thermo Scientific Revco®

Material, equipo y reactivos para extraer DNA de garrapatas infectadas con *Babesia bigemina*

Material biológico

- Garrapatas *Rhipicephalus microplus* infectadas con *B. bigemina* cepa Cintalapa, Chiapas.

Material

- Mortero y pistilo estériles a -70 °C.

Equipo

- Baño maría a 45° C. Marca Felisa No. de Catálogo FE-371.
- Espectrofotómetro. Marca Thermo Scientific Revco®, NanoDrop. Mod. 2000c.

Reactivos

- Agua libre de nucleasas. Promega, No. de cat. P1194
- Buffer de extracción para DNA pH8.
- Etanol 100%. Etanol. J.T. Baker. No. de catálogo: 9014-02
- Etanol 75 % en agua destilada.
- Disodium Ethylenediamine Tetraacetate. Marca Fisher Scientific. No. de cat. S311-500.
- Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 25:24:1. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. P3803.
- Proteinasa K. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. P2308.
- Sodium dodecyl sulfate. Marca SIGMA. No. de cat. L4509-250G.
- UltraPure™ Tris. Marca Invitrogen. No. de cat. 15504-020.

Soluciones

Buffer de extracción para DNA, pH8	
EDTA 10mM	37.22g
Tris 10mM	1.21g
SDS 0.5 %	5g
Agua destilada	Cbp. 1L

Etanol 70%	
Etanol absoluto	35ml
Agua destilada	15ml
Volumen final	50ml

Material, equipo y reactivos para la amplificación del gen *sbp4* de *B. bigemina*

Material

- Recipientes de plástico para tinción con bromuro.

Equipo

- Cámara de electroforesis. Marca Bio-Rad, No. de catálogo 170-4467.
- Fotodocumentador. Marca Bio-Rad Doc XR Model Universal Hood, No. de Catálogo: 200902015716.

Reactivos

- Agarosa. Marca Invitrogen. No. de cat. 16500-100.
- Agua libre de nucleasas. Marca Promega. No. de cat. P1194.
- Bromuro de Etidio. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. E1510.
- Buffer TAE 50x. Marca GIBCO. No. de cat. 24710.
- DNA de *B. bigemina.*
- Kit para purificación de producto de PCR. Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System. Marca Promega. No. de cat. A9281.
- PCR Master mix. Marca Promega. No. de cat. M750B

- Marcador de peso molecular. Marca Bio Rad. EZ Load^{TM} 500pb. No. de cat. L9703459. Y Marca Thermo Scietific. GenRuler 100pb Plus DNA ladder. No. de cat. SM0323.
- *Primer forward* SBP4FSPS. IDT. No. 87689281.
- *Primer reverse* SBP4. IBT. No. 2483.

Soluciones

Buffer TAE 1x	
TAE 50x	20ml
Agua destilada	980ml
Volumen final	1L

Bromuro de Etidio	
Bromuro de Etidio	
Agua destilada	50ml

Primer forward SBP4F 20µM	
Primer forward [200µM]	10µl
Agua libre de nucleasas	90µl
Volumen final	100µl

Primer reverse SBP4RCCP 20µM	
Primer reverse [200µM]	10µl
Agua libre de nucleasas	90 µl
Volumen final	100 µl

Material, equipo y reactivos para la clonación del *gen sbp4* de *B. bigemina*

Material

- Hielera.
- Mecheros Bunsen.
- Palillos de madera estériles.
- Cajas Petri de plástico. Marca Thermo Scientific.
- Haza de cultivo.

Equipo

- Baño maría a 42° C. Marca Felisa No. de Catálogo FE-371.

- Incubadora con agitación 37°C. Marca Thermo Scientific. MAXQ4450. Mod. 4333.

Reactivo

- Antibiótico sulfato de Kanamicina. Marca Invitrogen. No. de cat. 11815-024.
- Agar LB. Marca USB. No. de cat. 75852.
- Cloruro de sodio. Marca J.T.Baker. No. de cat. 3624-01.
- Enzima *Not I.* Marca Promega. No. de cat. R643A.
- Enzima *Asc I.* Marca BioLabs. No de cat. R0558S.
- Extracto de levadura. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. 92144.
- Kit para clonación. Marca Invitrogen. No. de cat. K2400-20.
- Kit para la purificación de DNA plasmídico. Marca GE Healthcare. No. de cat. 28-9042-64.
- Medio LB.
- Peptona de caseína. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. 70172

Soluciones

Kanamicina 50000x	
Kanamicina [765µg/mg]	0.065g
Agua libre de nucleasas	1ml

Medio LB	
NaCl	5g
Extracto de levadura	2.5g
Peptona de caseína	5g
Agua destilada	1L

Agar LB con Kanamicina [50µg/ml]	
Agar LB	8.75g
*Agua destilada	250ml
Kanamicina 50000x	250µl

*Esterilizar el agar antes de agregar el antibiótico

Medio LB con Kanamicina [50µg/ml]	
Medio LB	100ml
Kanamicina 50000x	100 µl

Material, equipo y reactivos para la expresión de la proteína SBP4

Material

- Cajas Petri. Marca Thermo Scientific.

Equipo

- Incubadora 25 °C. Marca Felisa No. de Catálogo FE-371.
- Expectrofotómetro. Marca Thermo Scientific Revco®, NanoDrop. Mod. 2000c.

Reactivos

- Antibiótico Ampicilina. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. A0166.
- Agar LB. Marca USB. No. de cat. 75852.
- Kit de expresión de proteínas. Marca Invitrogen. No. de cat. 11824-026.
- L-arabinosa. Marca SIGMA. No. de cat. A3256-25G.

Material para electroforesis de proteínas y Western Blot

- Membrana de nitrocelulosa. Marca BioRad. No. de cat. 162-0115.
- Papel filtro. Marca BioRad. No. de cat. 1703932.

Equipo para electroforesis de proteínas y Western Blot

- Kit de electroforesis para proteínas. Marca BioRad. Mini-protean 3.
- Cámara de transferencia de membranas. Marca BioRad.

Reactivos para electroforesis de proteínas y Western Blot

- Isopropanol. Marca J.T.Baker. No. de cat. 9080-01.
- Solución monómero acrilamida/bisacrilamida (30% t, 2.67% c).
- Tris HCl. Marca J. T. Baker. No. de cat. 4103-01.
- Sodium dodecyl sulfate. Marca SIGMA. No. de cat. L4509-250G.
- Persulfato de amonio. Marca BioRad. No. de cat. 161-0700.

- TEMED. Marca BioRad. No. de cat. 161-0801.
- Tris base. Marca Promega. No. de cat. H5131.
- β-mercaptoetanol. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. 36696LK.
- Glicerol. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. 200-289-5.
- Azul de bromofenol.
- Agua desionizada.
- Glicina. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. 241261-50G.
- Metanol. Marca J. T. Baker. No. de cat. 9093-03.
- Ácido acético glacial. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. 47395AM.
- Coomassie blue R-250. Marca Bio-Rad. No. de cat. 161-0400.
- NaCl. Marca J. T. Baker. No. de cat. 3624-01.
- Polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20. Marca SIGMA-ALDRICH. No de cat. P1379.
- Leche descremada. Marca Nestle.
- Anticuerpo anti-his tag de conejo. Marca Santa Cruz Biotechnology. Goat anti rabbit IgG-AP conjugado con fosfatasa alcalina. No de lote 21109.
- Anticuerpo anti-anticuerpo de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Marca. Santa Cruz Biotechology. His-probe (H-15) sc-803, rabbit polyclonal IgG, Lot. J2210.
- Revelador para fosfatasa alcalina. BCIP/NST solution. Marca SIGMA-ALDRICH. No. de cat. B604.
- Kaleidoscope. Precision Plus Protein Standar. No. de cat. 161-0375.

Soluciones

Ampicilina 100000x	
Ampicilina	0.1g
Agua libre de nucleasas	1ml

Medio LB con ampicilina [100µg/ml]	
Medio LB	100 ml
Ampicilina 100000x	100 µl

Agar LB con ampicilina [100µg/ml]	
Agar LB	
*Agua destilada	200ml
Ampicilina 100000x	200µl

*Esterilizar el agar antes de agregar el antibiótico

SDS 10% (p/v)	
SDS	10 g
Agua destilada	100ml

Buffer de carga 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	
Tris base ($NH_2C/CH_2OH)_3$)	3g
Agua destilada	100ml
HCl 6N para ajustar el pH a 6.8	

APS al 10% (p/v)	
APS	100mg
Agua destilada	1ml
Preparar diariamente, o hacer alícuotas y congelar a -20° C.	

Buffer de tanque o de corrida 1x.	
Tris-SDS 10x, pH 8.3	100ml
Agua destilada	900ml

Buffer de carga 4x	
Tris-HCl pH 6.5 (0.5M)	0.6 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS al 10%	1.6 ml
Azul de bromofenol 0.05%	0.4 ml
β-mercaptoetanol	0.4 ml
Agua desionizada	4.2 ml
Almacenar a t° ambiente	8 ml

Buffer de corrida 1.5 M tris-HCl, pH 8.8	
Tris base (NH2C/CH2OH)3)	18.5g
Agua destilada	100ml
HCl 6N para ajustar el pH a 8.8	

Tris-SDS 10x, pH 8.3	
Tris base	30g
Glicina	114g
SDS	10g
Aforar con agua destilada	1L
Mantener a 4°C	

Colorante Coomassie 0.025%	
Azul de Coomassie R-250	0.5g
[1]Metanol	800ml
Ácido acético	140ml
[2]Aforar con agua destilada	2 L
[1]Mezclar hasta que se disuelva. [2]Filtrar y guardar a t° ambiente.	

Solución fijadora	
Metanol	500ml
Ácido acético	70ml
Agua destilada	430ml

TBS 1x	
Tris base	0.6g
NaCl	4.38g
Aforar con agua destilada	500ml

TTBS	
TBS 1x	190ml
Tween 20, 0.05%	10ml

Solución bloqueadora	
TBS 1x	50ml
Leche descremada al 5 %	2.5g

Solución decoloradora	
Metanol	200ml
Etanol	100ml
Ácido acético	50ml
Agua destilada	650ml
Guardar a t° ambiente.	

Buffer de trasferencia	
Tris base	3g
Glicina	14.4g
Metanol	200ml
Aforar con agua destilada	1L

Solución para incubación de anticuerpos	
TTBS	50ml
Leche descremada al 1 %	0.5g

BIBLIOGRAFÍA

Alaa T. M., Junior S. F., Eko W. P., Xuan H. N., Minoda Y., AbouLaila M., Kawai S., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011a. Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. J. Elsevier Molecular and Biochemical Parasitology. 178: 40-45.

Alaa T. M., Xuan H. N., Eko W. P., Junior S. F., Aboulaila M., Ueno A., Kyoung G. Y., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011b. Spherical body protein 4 is a new serological antigen for global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. J. Clinical and vacciane immunology. 18 (2): 337-347.

Alaa T. M., Thekisoe O. M., Katasade C., Latif A. A., Mans J. B., Matthee O., Mkize N., Mabogoane N., Marais F., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011c. Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. J Veterinary Parasitology. 182: 337-342.

Altangerel K., Alhassan A., Iseki H., Sivakumar T., Boldbaatar D., Yokoyama N., Igarashi I. 2009. Evaluation of *Babesia bigemina* 200kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. J Parasitol Res. 105:249:254.

Barros CSL, Fighera R. Babesiosis. 2008. In: Foreign animal diseases. 7th edition. Boca Raton, FL: United States Animal Health Association, p.147-158.

Bernard P., Couturier M. 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. J. Mol. Biol. 226, 735-745.

Bock R., Jackson L., De Vos A., Jorgensen W. 2004. Babesiosis of cattle. J. Cambridge Parasitology. 129:247-269.

Bowman D. 2009. Georgis´ parasitology for veterinarians. 9th edition. Editorial SAUDERS. P 175-177.

Callow, L.L., Dalgliesh R.J. y De Vos, A.J. 1997. Development of effective Living vaccines against bovine babesiosis The Longest Field Trial? International Journal for Parasitology, vol. 27 No. 7. El Sevier Science. Printed in Great Britain. Milestones in parasitology.

Callow L. L. and Mc Gavin M. D. 1963. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. Aust. Vet. J. 39. 15-21.

Cao S., Oluga A. G., Alaa T. M., Yu M., Kamyingkird K., Luo Y., Li Y., Kyoung G. Y., Yamagishi J., Yokoyama N., Suzuki H., Igarashi I., Maeda R., Inpankaew T., Jittapalapong S., Xuan X. 2012. Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in northern Thailand. Parasitol res, 111:1259-1266.

Cheng C., Shuman S. 2000. Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of Topoisomerase IB-Induced Double-Strand breaks. Mol. Cell. Biol. 20, 8059-8068.

Cordero D. C. M., Rojo V. F. A., Martínez F. A. R., Sánchez A. M. C., Hernández R. S., Navarrete L. C. I., Diez B. P., Quiroz R. H. y Carvalho V. M. 2001. Parasitología veterinaria. Editorial McGraw-Hill interamericana. España. P. 70.

Cseke L. J., Kaufman P. B., Podila G. K., Tsaí C. J. 2004. Handbook of molecular and celular methods in biology and medicine. 2nd. Edition. CRC PRESS. USA.

Dowling A. C., Perryman L. E., Jasmer D. P. 1996. A *Babesia Bovis* 225-kilodalton spherical—body protein: localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after Merozoite invasion. American Society for Microbiology. 64(7):2618-2626.

Drago S. M. E., Sainz E. T. D. R. 2006. Sistemas de expression para proteínas terapéuticas recombinantes. Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 37 (1): 38-44.(en línea).

Figueroa M. J. V. (2006). Magistrales. Control de la babesiosis bovina: situación actual y perspectivas. Asociación mexicana de parasitólogos veterinaios, A. C., VII congreso nacional de pasrasitología veterinaria Acapulco.

GE Healthcare. 2008. Illustra plasmidPrep mini spin kit. For de rapid extraction and purification of plasmid DNA from small scale cultures of *E. coli.* Consultado el 20 de agosto de 2012. Disponible en: https://www.gelifesciences. com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28951 561AF_20110831095457.pdf

Goncalves R. P. M., Passos L. M. F., Machado R. z., Lima J., Ribeiro M. F. B. 2001. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of IgM antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. Mem Inst Oswaldo Curz, Río de Janeiro, 96(2):237-240.

Goosen N., Van de Putte P. 1995. The regulation of transcription initiation by integration host factor. Mol. Microbiol. 16, 1-7.

Guillemi E., Ruybal P., Lia V., González S., Farber M., Wilkowsky S. E. 2013. Multi-locus typing scheme for Babesia bovis and Babesia bigemina reveals high levels of genetic variability in strains from Northern Argentina. Infection, genetics and evolution. 14 (2013) 214-222.

Homer M. J., Aguilar D. A., Telford III S. R., Krause P. J., Persing D. H. 2002. Babesiosis J. Clin. Microbiol. 13:451-469.

Hunfeld K. P., Hildebrandt A., Gray J. S. 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient diseas. J. International Journal for parasitology 38:1219-1237.

Invitrogen. 2006. pENTR^{TM} Directional TOPO® cloning kits. Five-minute, directional TOPO® cloning of blunt-end PCR products into an entry vector for the

Gateway® system. Consultado el 15 de junio de 2012. Disponible en http://openwetware.org/images/b/bd/PENTR_Directional_TOPO_Cloning_Kit.pdf

Invitrogen. 2012. *E. coli* expression system with Gateway® technology. Gateway®-adapted destination vectors for cloning and high-level expression of native or tagged recombinant proteins in *E. coli*. Consultado el 27 de enero de 2013. Disponible en: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ecoli_gateway_man.pdf

Janeway C. A., Travers P., Walport M. y Capra J. D. 1999. Immunobiology: The immune system in health and disease. 4ed. Current Biology Publications Pp: 40-53.

Jenkins M.C. 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of importance, Veterinary Parasitology. Vol. 101 Pp. 291-310.

Landy A. 1989. Dynamic, structural and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination. Ann. Rev. Biochem. 58, 913-949.

Lee N. 1980. Molecular Aspects of *ara* Regulation. In *The Operon*, J. H. Miller and W. S. Reznikoff, eds. Cold Spring Harbor Laboratory. Pp. 389-410.

Lee N., Francklyn C., y Hamilton E. P. 1987. Arabinose-Induced Binding of AraC Protein to *ara*I2 Activates the *ara*BAD Operon Promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8814-8818.

Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. 2008. Molecular Cell Biology. 6th edition. W. H Freeman and Company. USA. P. 351

Marcelino I., Martinho A. A., Ventosa M., Pruneau L., Meyer D. F., Martinez D., Lefrancois N. V., Varela C. A. 2012. Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccianes. Journal of proteomics 72:4232-4250.

Miller R., Estrada P. A., Almazán C., Allen A., Jory L., Yeater K., Messenger M., Ellis D., Pérez de León A. A. 2012. Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle fever tick, Rhipicephalus (Boophilus) annulatus. J. Elsevier. 30: 5682-5687.

Minjauw B, McLeod A. 2003. Tick-borne diseases and poverty. The impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihood of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. Edinburgh: Centre for Tropical Veterinary, Medicine, University of Edinburgh, UK.

Mosqueda G. J. J., Ramos A. A., Falcó N. A., Figueroa M. J. V., Álvarez M. J. A. (2004). Generalidades de la babesiosis bovina; centro nacional de investigación disciplinarian en parasitología veterinaria; Folleto técnico No. 3.

Mosqueda, J. J., Castro, L. A., Falcón, A., Ramos, A., Benítez, D., Alcaráz, E., Figueroa, J. y Alvarez, A. 2007. *In silico* comparative analysis of the glycoprotein 45 in a vaccinal strain and field isolates of *Babesia bigemina* from México and Argentina. Parassitologia. University of Rome “La sapienza” Official Journal of the Italian society of parasitology. Lombardo Editore. 49 Supple 1, pag:95

Mosqueda G. J. J. 2010. SAGARPA. Diagnóstico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. 11. Extracción de ADN de hemoparásitos. Pp. 178-191. México.

Mosqueda J., Olvera R. A., Aguilar T. G., Cantó G. J. 2012. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. Current Medicinal Chemistry. 19: 1504-1518.

OIE, 2010. The manual of diagnostic and vaccines for terrestrial animals (Terrestrial Manual) 9th Ed. The World Organisation for Animal Health. p 606.

Ogden S., Haggerty D., Stoner C. M., Kolodrubetz D., Schleif R. 1980. The *Escherichia coli* L-Arabinose Operon: binding sites of the regulatory proteins and a

mechanism of positive and negative regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3346-3350.

Osorno E. M. 1978. Babesiosis en México. Veterinaria México; (9): 203-218.

Ptashne M. 1992. A Genetic Switch: Phage (Lambda) and higher organisms (Cambridge, MA: Cell Press).

Promega. 2010. Wizard® SV gel and PCR clean-up system. Part#TB308. Consultado el 10 de agosto de 2012. Disponible en: http://www.promega.com/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/Wizard%20SV%20Gel%20and%20PCR%20Clean-Up%20System%20Protocol.pdf

Quiroz R. H. 1990. Parasitología. Editorial Limusa. México. P. 59.

Ruef A. J., Dowling S. C., Conley P. G., Perryman L. E., Brown W. C., Jasmer D. P., Rice-Ficht A. C. 1999. A unique *Babesia bovis* spherical protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocytes membrane. J. Molecular and Biochemical Parasitology 105(2000):1-12.

SAGARPA. 2012. XII FORO SIAP-SAGARPA expectativas del sector agroalimentario y pesquero. México.

SAGARPA. 2012. Acuerdo por el que se establece la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp*. Título tercero, de las zonas en control.

Sambrook, J., D. F. Fritsch, *et al.* 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NewYork, Cold Spring Harbor Press.

Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd edition. Cold spring harbor laboratory press. USA.

Schleif R. S. 1992. DNA Looping. Ann. Rev. Biochem. 61, 199-223.

Schnittger, L., Rodriguez A. E., Florin C. M., Morrison D. A. 2012. Babesia: A world emerging. J. Elsevier. 12:1788-1809.

Shuman S. 1991. Recombination mediated by vaccinia virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10104-10108.

Shuman S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA Topoisomerase. J. Biol. Chem. 269, 32678-32684.

Sinah N., Williams C. A., Piper R. C., Brookhart S. D. 2012. A ser of dual promoter vectors for high throughput cloning, screening, and protein expression in eukaryotic and prokaryotic systems from a single plasmid. J. BMC biotechnology, 12:54.

SIAP. Cattle population in México 1999-2008. www.sagarpa.gob.mx, 2008.

Solorio, R. J. L., Rodríguez, V. R. I. 1997. Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. Rev. Biomed. 8:37-47.

Suárez C. E. Noh S. 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. J. Veterinary parasitology 180:109-125.

Tagu D., Maussard. 2006. Techniques for molecular biology. Vectors and cloning. Ed. INRA.

Uilenberg, G. 2006. *Babesia*-a historical overview. J. Vet. Parasitology. 138:3-10.

USAHA. 2008. Foreign animal diseases. 7th. Ed. United State Animal Health Association. p. 147.

Wassenaar, T. 2002. Index of DNA purity. Ask as scientist. Molecular Biology Archive. Consultado el 3 de abril del 2013. Disponible en http://www.newton.dep.anl.gov/askasci/mole00/mole00371.htm

Weisberg R. A., Landy A. 1983. Site-Specific recombination in Phage Lambda. In Lambda II, R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl and R. A. Weisberg, eds. Cold Spring Harbor Press. Pp. 211-250.

Weiss, J. B. 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 8(1): 113-130.